

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2019

Adriana Čáková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SUROVINY NA BÁZI STŘÍBRA PRO KOSMETICKÉ ÚČELY

SILVER BASED RAW MATERIALS FOR COSMETIC PURPOSES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adriana Čáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1437/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Adriana Čaková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Suroviny na bázi stříbra pro kosmetické účely

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte podrobnou literární rešerši na téma:
 - kosmetické suroviny na bázi stříbra, jejich zamýšlená funkce, fyzikálně chemické charakteristiky, toxikologický profil, legislativní rámec
 - otázka bezpečnosti a reálné účinnosti těchto surovin
 - přehled metod pro jejich analýzu
2. Ověřte antimikrobiální účinky vybraných surovin a kosmetických přípravků na některé druhy mikroorganismů.
3. Vyhodnocení dat, diskuse, formulace závěrů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Adriana Čaková
student(ka)

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma kosmetických surovin na bázi stříbra a ověření antimikrobiálního účinku vybraných surovin a přípravků na některé druhy mikroorganismů.

Teoretická část je zaměřena na problematiku kosmetických surovin na bázi stříbra, na jejich zamýšlenou funkci, fyzikálně-chemické charakteristiky a toxikologický profil. Zároveň je v teoretické části zmíněna problematika legislativního rámce, otázka bezpečnosti a reálné účinnosti sledovaných surovin.

Experimentální část byla zaměřena na studium antimikrobiálního účinku vybraných kosmetických surovin a přípravků na bázi stříbra. Celkem byly použity 2 vzorky, jedna surovina a jeden zakoupený přípravek, u kterých byla sledována antimikrobiální aktivita vůči použitým mikroorganismům, kterými byly *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea*, *Serratia marcescens* a *Candida vini*.

Z výsledků je patrné, že antimikrobiální aktivita byla pozorována jak u použité suroviny, tak u přípravku, avšak ne u všech použitých mikroorganismů.

ABSTRACT

The purpose of this bachelor's thesis was a research about silver based cosmetic products and determination of antimicrobial activity on certain species of microorganisms by chosen silver based cosmetic products.

Theoretical part is focused on the problematics of silver based cosmetic products, on their main purpose, physically chemical characteristics and toxicological profile. In the theoretical part is also mentioned problematics of legislative, mainly the safety and real effectivity of tested cosmetic products.

Experimental part was focused on determination of antimicrobial activity of chosen silver based cosmetic products. Two silver based cosmetic product were used to determined antimicrobial activity on selected microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea*, *Serratia marcescens* a *Candida vini*.

From result it is apparent, that both of used Cosmetic product showed antimicrobial activity, but not on every used microorganism.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antimikrobiální látka, Antimikrobiální účinek, Kosmetické přípravky, Mikroorganismy, Nanočástice, Stříbro

KEYWORDS

Antimicrobial substance, Antimicrobial activity, Cosmetic product, Microorganisms, Nanoparticles, Silver

ČAKOVÁ, Adriana. *Suroviny na bázi stříbra pro kosmetické účely*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113970>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jana Zemanová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Především bych nejvíce ráda poděkovala mé vedoucí práce paní Ing. Janě Zemanové Ph.D., za veškerou pomoc a rady při zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petře Matouškové Ph.D. za čas a pomoc při měření v laboratoři. Také bych ráda poděkovala paní laborantce Radce Novákové, která byla vždy ochotná v laboratoři pomoci.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1	Kosmetika a kosmetologie.....	8
2.1.1	Konzervační látky v kosmetice	9
2.2	Stříbro	9
2.3	Toxicita stříbra.....	10
2.3.1	Argyrie.....	10
2.4	Evropská legislativa v oblasti kosmetologie	10
2.4.1	Kosmetické přísady	10
2.4.2	Kosmetické přípravky a jejich značení	11
2.4.3	Nanočástice v kosmetice.....	12
2.5	Nanostříbro	14
2.5.1	Nanostříbro v kosmetice	14
2.5.2	Syntéza nanočástic stříbra.....	14
2.5.3	Charakterizace nanočástic stříbra.....	15
2.5.4	Účinky nanostříbra na mikroorganismy	16
2.5.5	Velikost a koncentrace částic vzhledem k účinku	17
2.5.6	Mechanismus účinků nanostříbra.....	18
2.5.7	Toxicita nanostříbra	19
2.6	Přehled kosmetických surovin s obsahem stříbra.....	20
2.6.1	Chlorid stříbrný (INCI: <i>Silver Chloride</i>).....	24
2.6.2	Síran stříbrný (INCI: <i>Silver Sulfate</i>)	25
2.7	Metody stanovení antimikrobiální aktivity.....	25
2.7.1	Semikvantitativní metody	25
2.7.2	Kvantitativní – diluční metody	26
2.8	Metody charakterizace částic.....	26
2.8.1	Stanovení velikosti částic – DLS	26
2.8.2	Stanovení zeta potenciálu	27
2.8.3	UV-VIS spektroskopie.....	28
2.9	Mikroorganismy použité na sledování antimikrobiální aktivity.....	28
2.9.1	<i>Rod Serratia</i>	28
2.9.2	<i>Rod Bacillus</i>	28
2.9.3	<i>Rod Micrococcus</i>	29
2.9.4	<i>Rod Kocuria</i>	29
2.9.5	<i>Rod Candida</i>	29

3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Seznam použitých přístrojů a pomůcek	30
3.2	Seznam použitých chemikálií	30
3.3	Přípravky a suroviny použité ke stanovení antimikrobiální aktivity	30
3.3.1	Viposilver	30
3.3.2	PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm	31
3.4	Použité mikroorganismy ke stanovení antimikrobiální aktivity	31
3.5	Příprava bujónu a kultivačního média	31
3.5.1	Kultivace bakterií	31
3.5.2	Kultivace kvasinek	32
3.6	Ověření antimikrobiální aktivity	32
3.6.1	Statistické vyhodnocení antimikrobiální aktivity	32
3.7	Charakterizace částic	33
3.7.1	Stanovení velikosti částic	33
3.7.2	Stanovení zeta potenciálu	33
3.7.3	Absorpční spektrum nanočástic	33
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	34
4.1	Ověření antimikrobiální aktivity	34
4.2	Stanovení velikosti částic	40
4.3	Stanovení zeta potenciálu	41
4.4	Absorpční spektrum nanočástic	41
5.	ZÁVĚR	44
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53
8.	PŘÍLOHY	54

1. ÚVOD

Stříbro bylo již v historii používáno pro své dobré antimikrobiální účinky, nejčastěji pak v lékařství. Zde bylo využíváno k léčení nejrůznějších kožních infekcí a odstranění bradavic, ke zklidnění se používalo stříbro v akupunktuře [1].

Již v antickém Egyptě používali v kosmetice barevné pigmenty s obsahem stříbra na zkrášlování, a to hlavně v oblasti obličeje. Pigmenty s obsahem stříbra se používaly k barvení očních víček apod [1].

V posledních letech dochází k prudkému vývoji nanočástic v nejrůznějších odvětvích. V kosmetice tomu není jinak, a i zde se s využíváním nanočástic setkáváme stále častěji. S používáním nanočástic je ale třeba být obezřetný, a i z toho důvodu je oblast nanokosmetiky ohlídána směrnicemi a nařízeními, které dohlíží na bezpečné využívání nanomateriálů, ale i dalších v kosmetice využívaných látek.

Nanostříbro se v kosmetice využívá pro jeho konzervační (antimikrobiální) účinky. Nejvyužívanější nanočástice stříbra jsou např. chlorid stříbrný, síran stříbrný, nejrůznější stříbrné soli atd. Nanostříbrem se už několik desetiletí zabývá spousta studií, kde vedle antimikrobiálních účinků byly pozorovány i účinky toxické. Právě otázka koncentrace, kdy jsou nanočástice stříbra ještě dostatečně účinné vůči patogenním mikroorganismům a zároveň nemají jakýkoliv negativní vliv na lidský organismus, je v posledních letech často probírána.

Cílem práce bylo zpracovat literární rešerši na téma kosmetických surovin na bázi stříbra, jejich zamyšlenou funkci, fyzikálně-chemické charakteristiky, toxikologický profil a legislativní rámec. Součástí legislativního rámce bylo cílem zpracovat otázku bezpečnosti a reálné účinnosti těchto surovin a přehled metod pro jejich analýzu. Dalším cílem bylo ověření antimikrobiálních účinků vybrané suroviny a zakoupeného přípravku na některé druhy mikroorganismů.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kosmetika a kosmetologie

Kosmetika, z řeckého *kosmetiké*, což v překladu znamená umění krášlit, byla již v minulosti spojena s krásou lidského těla. Jejím účelem bylo uchovat či zlepšit jeho vzhled. Již ve starověkém Egyptě se barevné pigmenty z minerálů používali k barvení očních víček a očního okolí. V dnešní době je kosmetika spíše nežli jako umění, definována jako věda zvaná kosmetologie. Kosmetologie úzce souvisí s mnoha vědními disciplínami, např. přírodovědnými nebo lékařskými. Nejvíce spjatá je ovšem s dermatologií, tedy vědou zaměřující se na největší orgán těla, kůži. Kůže je pro lidské tělo velmi důležitým orgánem, jelikož je hranicí mezi organismem a vnějším prostředím, a je tedy takovou první obrannou vrstvou organismu. Dermatologie se pak zajímá o to, zda vzniklé kosmetické přípravky nějakým způsobem nepoškozují kůži, případně nezpůsobují jiné zdravotní problémy [1, 2].

Rozdíl mezi kosmetikou a kosmetologií je možné popsat např. takto [1]:

- *Kosmetologie je věda zahrnující biologii kůže, výzkum a přípravu kosmetických přípravků, ověřování jejich vlastností a způsobů použití.*
- *Kosmetika je praktická činnost, při níž buď žena sama, nebo kosmetička v rámci své profese využívá (nebo by měla využívat) výsledky kosmetologie ku svému prospěchu nebo ku prospěchu svých klientů. Nedílnou část této praktické činnosti tvoří estetická a módní hlediska.*

Kosmetické přípravky je možné rozdělit do širokého spektra kategorií. Kategorie jako make-up pudry, toaletní mýdla, parfémy, sprchové doplňky, depilátory, deodoranty, produkty určené k intimní hygieně atd. Obecně je možné přípravky rozdělit do 6 kategorií [1, 2].

1. Přípravky kosmeticko-hygienické:
 - a. ke koupelím, mytí a čištění: např. voda, pleťové vody, mýdla;
 - b. s dezodoračními, antiperspiračními, eventuálně dezinfekčními účinky, včetně přípravků pro intimní hygienu;
 - c. tělové lotiony, krémy, oleje a pudry;
 - d. ochranné opalovací přípravky.
2. Speciální přípravky k péči o pleť a pleť obličej:
 - a. ochranného charakteru;
 - b. regeneračního a tonizačního charakteru.
3. Speciální přípravky k péči o ruce a nehty:
 - a. ochranné;
 - b. regenerační.
4. Přípravky dekorativní kosmetiky:
 - a. určené k vytváření barevných efektů na kůži a nehtech, eventuálně ke krytí vzhledových vad;
 - b. bělící přípravky;
 - c. přípravky depilační a přípravky k holení, eventuálně jinému mechanickému odstraňování chloupků.
5. Přípravky vlasové kosmetiky.
6. Kolínské vody a parfémy.

Toto rozdělení však není zcela všeobecné, jelikož pohled na to, co je to kosmetický přípravek a co již např. léčivo, se v různých státech liší. Např. to, co je považováno za kosmetický přípravek v Evropě, již v USA je možné považovat za volně dostupné léčivo [2].

2.1.1 Konzervační látky v kosmetice

V kosmetice se využívá k přípravě kosmetických přípravků velké množství chemických látek. Základem jsou asi nejvíce různé tuky, vosky, mastné kyseliny a samozřejmě voda. Kromě těchto látek se do kosmetických přípravků přidávají látky, které mají za úkol např. upravit vzhled, vůni, stabilitu apod. U kosmetických přípravků, které obsahují vodu, jsou to např. emulze nebo gely, je velká pravděpodobnost výskytu mikroorganismů, konkrétně bakterií, kvasinek nebo plísní. Tyto mikroorganismy nejen že mohou způsobit rozklad kosmetického přípravku na látky, které mohou způsobit podráždění pokožky, ale mohou také způsobovat nejrůznější infekce, které mohou vést k závažnějšímu onemocnění kůže. Dále mohou vést mikroorganismy ke změně konzistence, chuti, vůně kosmetického přípravku. Z tohoto důvodu se do kosmetických přípravků přidávají látky konzervační (antimikrobiální). Jako konzervační přísadu tedy považujeme látku, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku. Přídavkem konzervační látky můžeme pozorovat účinky bakteriostatické (zastavující růst bakterií), bakteriocidní (bakterie usmrcující), dále také účinky fungistatické (zastavující růst plísní a kvasinek) a fungicidní (usmrcující plísně a kvasinky) [1, 3-5].

Konzervační látky mají bránit mikrobiální kontaminaci během výroby a balení kosmetického přípravku, a zároveň chránit vzniklý produkt před možnou mikrobiologickou kontaminací po celou dobu užívání do minimální trvanlivosti produktu. Jako kosmetické konzervační látky se využívají např. sulfáty, izotiazolíny, fenoxylethanol nebo parabeny, ty ovšem mohou způsobovat zvýšenou citlivost na ultrafialové záření a zároveň mohou být zodpovědné za alergické reakce. V kosmetickém průmyslu je stále větší důraz na hledání alternativních konzervačních látek. Po objevení antimikrobiálního účinku malých částic kovů, začaly být tyto částice využívány v širokém spektru ke kontrole bakteriálního růstu [4-6].

2.2 Stříbro

Stříbro patří mezi tzv. ušlechtilé kovy, je bílo-šedé barvy a má velmi dobrou elektrickou a tepelnou vodivost. Stříbro má velkou afinitu k síře, která se také projevuje černáním stříbrných předmětů, které jsou jejím vlivem např. na vzduchu vystaveny. V přírodě tvoří především sloučeniny se sírou a nalezneme je tak nejčastěji ve formě sulfidických rud. Asi nejvýznamnější je argentit (leštěnec stříbrný, Ag_2S). Ryzí stříbro se vyskytuje v přírodě vzácně. V periodické tabulce prvků je možné je najít mezi přechodnými d-prvky jako prvek skupiny mědi. Nejčastěji se vyskytuje s oxidačním číslem 0 a +1. Oxidační stav +1 patří u stříbra mezi nejstabilnější stav. Mezi nejznámější sloučeniny stříbra patří halogenidy nerozpustné ve vodě – AgCl , AgBr a AgI . Tyto sloučeniny jsou citlivé na světlo a rozkládají se působením záření, přičemž vylučují kovové stříbro. Těchto vlastností je využíváno při fotografování. Naopak oxidy stříbra nejsou díky jeho slabé afinitě ke kyslíku příliš stálé [7-10].

Důkazy o využívání stříbra v lékařství se nesou již tisíce let zpátky, např. v Číně se využívalo stříbro v akupunktuře, kde stříbrné jehlice měly sloužit k uklidňování a uvolnění. Tyto jehlice jsou využívány dodnes. Ve starověkém Římě naopak používali stříbro v balzámech za účelem hojení kožních problémů. Kromě léčení používali Římané stříbro také jako materiál pro výrobu nádob, kde uchovávali potraviny, přičemž zjistili, že takto uchovávané potraviny vydrží déle čerstvé. V Indii připisovali stříbru terapeutické účinky vůči mnoha druhům chorob. S využíváním stříbra k uchovávání čerstvosti potravin je možné se setkat i ve středověku, kde se používalo stříbrné nádobí a přístroje, a to zejména u šlechtických rodů. Používáním stříbrných přístrojů a nádobí se u některých šlechticů vyvinulo šedo-modré zbarvení kůže, od kterého bylo odvozeno známé označení „modrá krev“. V 15. století dostávala dokonce šlechta slánky s mletým stříbrem, které si přidávali do jídla. Dusičnan stříbrný se v minulosti používal také k odstraňování bradavic jako tzv. *lapis infernalis*, v překladu pekelný kámen. Koloidní roztoky stříbra, stabilizované bílkovinami v preparátech, se využívali jako oční nebo nosní kapky, z důvodu jejich mírného a nedráždivého antiseptického účinku [11-13].

2.3 Toxicita stříbra

Stříbrné ionty mohou být ve vyšších koncentracích již značně toxické, a to hlavně z důvodu srážení bílkovin. Po perorálním příjmu stříbra, může vyvolat pálení v trávicím traktu, průjem. Při chronickém podání může vést až k argyrii. Smrtelná dávka stříbra, jako stříbrné soli, činí pouze 2 gramy na kilogram [13].

Rozpustné sloučeniny stříbra mohou způsobovat poškození jater nebo ledvin, dále mohou způsobit podráždění očí, kůže, dýchacích cest a trávicího ústrojí. Kromě těchto poškození byly pozorovány toxické účinky na množení a uvolňování cytokinů u periferních krevních mononukleárních buněk [14, 15].

2.3.1 Argyrie

Již dlouhou dobu je známo, že dlouhodobé vystavení organismu účinkům stříbra není žádoucí. Právě jako argyrii popisujeme dlouhodobější vystavení organismu účinkům stříbra, které vedou k šedomodrému zbarvení kůže, vlasových váčků, žláz, kapilár atd. Šedomodrá barva je způsobená ukládáním malých částic stříbra v tkáních. Argyrie jako taková není pro lidský organismus nebezpečná, či zdraví škodlivá, avšak není vratná, alespoň dosud nebyl nalezen způsob, jakým by se mohlo uvolnit uložené stříbro z tkání [16].

2.4 Evropská legislativa v oblasti kosmetologie

2.4.1 Kosmetické přísady

Za přísadu je považována jakákoliv látka nebo směs látek, která byla záměrně použita v kosmetickém přípravku během výrobního procesu. Za přísady není možno považovat nečistoty v použitých surovinách a technické pomocné materiály použité při mísení a ty, které nejsou přítomny v konečném přípravku. Suroviny pro výrobu kosmetických přípravků mohou mít různý původ, mohou to být látky minerální, syntetické, produkované biotechnologickými procesy, izolované z rostlin nebo mohou být použity kombinace všech těchto zdrojů [3, 17].

V kosmetice jsou využívány látky s nejrůznějšími vlastnostmi, mohou to být např. emulgátory, abrazivní látky, absorbenty, antimikrobiální látky, látky konzervační, deodorační přísady, hydrofilní přísady, zahušťovadla, stabilizátory, filmotvorné látky, antioxidační látky, neutralizační látky a mnoho dalších [2, 70].

Všechny použité suroviny ve finálním přípravku musí mít zdokumentovanou bezpečnost, která obsahuje informace o akutní toxicitě, absorpci kůže, možné podráždění kůže, subchronické toxicitě, mutagenitě, fototoxicitě, fotomutagenitě atd. [17].

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009 by v zájmu bezpečnosti výrobků měly být zakázány látky přijatelné ve stopovém množství, pouze pokud je to při správné výrobní praxi technologicky nevyhnutelné a pokud je výrobek bezpečný [3].

Použitím Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. 12. 2006 jsou zohledněny environmentální obavy, které mohou vzbuzovat látky používané v kosmetických přípravcích. Jedná se o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek a o zřízení Evropské agentury pro chemické látky [3].

Omezení týkající se obsahu kosmetických přísad v kosmetických přípravcích [3, 17]:

1. Nesmí obsahovat zakázané látky, které lze nalézt v příloze II. obsažené v Nařízení (ES) 1223/2009.
2. Nesmí obsahovat látky podléhající omezení v rozsahu překračujícím toto omezení.
3. Nesmí obsahovat barviva, která nejsou uvedena v příloze IV. obsažené v Nařízení (ES) 1223/2009 ani barviva, která jsou v ní uvedena, avšak použita v rozporu s podmínkami v ní ustanovenými.
4. Nesmí obsahovat konzervační přísady, které nejsou uvedeny v příloze V. obsažené v Nařízení (ES) 1223/2009 ani konzervační přísady, která jsou v ní uvedena, avšak použita v rozporu s podmínkami v ní ustanovenými.
5. Nesmí obsahovat filtry ultrafialového záření, které nejsou uvedeny v příloze VI. obsažené v Nařízení (ES) 1223/2009 ani filtry, která jsou v ní uvedena, avšak použita v rozporu s podmínkami v ní ustanovenými.

2.4.2 Kosmetické přípravky a jejich značení

Za kosmetické přípravky jsou považovány produkty jako např. make-upy, pudry, toaletní mýdla, parfémy, sprchové přípravky, depilátory, deodoranty, antiperspiranty, dále také produkty určené k intimní hygieně, produkty na kůži, vlasy, nehty atd. [2].

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009, které bylo schváleno v roce 2009 a nejnověji aktualizováno od 11. 7. 2013 popisuje kosmetický přípravek jako jakoukoliv látku nebo směs látek, která je určena ke styku s vnějšími částmi lidského těla, zuby a sliznicemi ústní dutiny výhradně za účelem jejich čištění, parfemace, změny vzhledu, ochrany, udržení v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů [2, 3].

Dále legislativa pojednává o transparentnosti, kdy přísady používané v kosmetických přípravcích by měly být uvedeny na jeho vnějším obalu. Pokud není možné přísady takto uvést, měly by být tyto údaje přiloženy tak, aby k nim měl spotřebitel přístup [3, 18].

Posuzováním toho, zda se jedná o kosmetický přípravek se také zabývá Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009, přičemž každý přípravek je posuzován případ od případu, kdy se přihlédne k veškerým vlastnostem přípravku [3].

Kosmetické přípravky by měly být za běžných nebo rozumně předvídatelných podmínek použití bezpečné. Zejména by z hodnocení rizik a prospěšnosti neměla vyplynout přípustnost rizika pro lidské zdraví. V případě, že se jedná o kosmetické přípravky, které by mohly ohrozit lidské zdraví, přestože vyhovují ustanovením tohoto nařízení, měl by být zaveden ochranný postup [3].

Co se bezpečnosti týče, měly by být potřebné informace o složení přípravku zaslány toxikologickým střediskům a obdobným subjektům, pokud byla taková střediska členskými státy za tímto účelem zřízena. Cílem tohoto nařízení je umožnit rychlé a náležité lékařské ošetření v případě obtíží. Dále z důvodů účinného dozoru nad trhem by měly být určité informace o kosmetickém přípravku uváděném na trh oznamovány příslušným orgánům [3].

Jako informační portál slouží CPNP (*The Cosmetics Product Notification Portal*), což je Evropský portál kosmetických přípravků, kde musí být zapsán každý kosmetický přípravek uváděný na trh. Portál nachází uplatnění hlavně ve snazších kontrolách přípravků používaných a uváděných na trh v Evropské unii [19].

Obchodní úprava kosmetického přípravku, zejména pokud jde o jeho formu, vůni, barvu, vzhled, balení, označení, objem či velikost, by neměla ohrozit zdraví a bezpečnost spotřebitelů tím, že by došlo k záměně s potravinami, v souladu se směrnicí Rady 87/357/EHS ze dne 25. 6. 1987, v současné době pod regulací 2001/95/EC, o sbližování právních předpisů členských států týkajících se výrobků, jejichž skutečná povaha není rozpoznatelná, a které proto ohrožují zdraví nebo bezpečnost spotřebitelů [3].

Kosmetický přípravek smí být dodáván na trh dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady 1223/2009 pouze pokud jsou na obalu, do kterého je přípravek naplněn tyto údaje, které musí být nesmazatelné, čitelné a viditelné [3, 18].

1. Jméno nebo zapsaný název a adresa odpovědné osoby.
2. Země původu kosmetického přípravku dováženého do Evropské unie.
3. Jmenovitý obsah v době balení, vyjádřený v hmotnosti nebo objemu, s výjimkou balení obsahující méně než 5 g nebo 5 ml, dále bezplatných vzorků a balení na jedno použití.
4. Datum minimální trvanlivosti, do které je kosmetický přípravek skladovatelný a za vhodných podmínek schopný nadále plnit svou původní funkci. Datum musí být zřetelně uvedeno a musí obsahovat buď měsíc a rok nebo den, měsíc a rok.
5. Zvláštní upozornění týkající se použití a skladování.
6. Číslo šarže nebo odkaz umožňující identifikaci kosmetického přípravku.
7. Funkce kosmetického přípravku, pokud není zřejmá z jeho obchodní úpravy.
8. Seznam přísad, které mohou být uvedeny pouze na vnějším obalu. seznamu musí předcházet slovo „ingredients“. Přísady musí být v sestupném pořadí dle hmotnosti v době přidání do kosmetického přípravku. Přísady v koncentracích menších než 1 % mohou být uvedeny v jakémkoli pořadí po přísadách, jejichž koncentrace překračuje 1 %. Pokud jsou v přípravku přítomny nanomateriály, musejí být také vyjmenovány a za jejich názvy musí být v závorkách „nano“.

2.4.3 Nanočástice v kosmetice

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009 popisuje jako nanomateriál nerozpustný nebo bioperzistentní a záměrně vyrobený materiál o jednom nebo více vnějších rozměrech nebo

s vnitřní strukturou v řádu od 1 do 100 nm. Směrnice se zaměřuje hlavně na takovéto systémy, nikoliv na nanomateriály rozpustné, případně rozložitelné v biologických systémech, jako jsou liposomy, emulze atd. [3, 20].

Použití jakéhokoliv druhu nanomateriálu v kosmetických přípravcích je povinné nahlásit Komisi a to 6 měsíců před jejich uvedením na trh. Informace, které jsou předávány Komisí musí obsahovat [3]:

1. Identifikaci nanomateriálu, jeho chemický název dle IUPAC.
2. Přesné vymezení nanomateriálu, včetně velikosti částic, fyzikálních a chemických vlastností.
3. Odhadované množství nanomateriálu obsaženého v kosmetickém přípravku.
4. Toxikologický profil nanomateriálu.
5. Informace o bezpečnosti nanomateriálu týkající se kategorie kosmetického přípravku, ve kterém je nanomateriál použit.
6. Rozumně předvídatelné podmínky expozice.

Jako ingredience musí být nanomateriály zřetelně uvedeny na obalu s příponou nano, která má být umístěna za identifikací INCI. Přípona nano by měla, pokud možno být uvedena v závorce, přičemž není přesně specifikováno, v jakém typu závorky. Název nanomateriálu by měl tedy vypadat např. takto: síran stříbrný (nano) nebo SÍRAN STŘÍBRNÝ (NANO) [18, 20].

Vzhledem k bezpečnosti je nutné k nanomateriálům dodávat nejrozsáhlejší informace, jako jejich vlastnosti, chování, biologické aktivity apod. Charakterizace nanomateriálů je považována za nejdůležitější identifikaci. Každý nanomateriál má specifické (bio)chemické složení vnitřní i na povrchu. Vlastnosti a chování nanomateriálu je ovlivněno nejen jejich velikostí, morfologií, povrchem ale i samotnými vlastnostmi látky ze které je nanomateriál vyroben. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanomateriálu by měly být charakterizovány v pěti stádiích, a to v čerstvě připraveném stavu, po dodání na přípravu produktu, ve finálním produktu, při toxikologickém testování a jako přítomné v biologických tekutinách a tkáních během testování. Vzhledem ke kosmetice musí být dodrženy minimálně tři charakterizace, a to čerstvě připravené suroviny, po přidání do kosmetického produktu a během toxikologického testování. Popsané by měly být vlastnosti jako např. chemická identita a složení, velikost, morfologie, charakterizace povrchu, rozpustnost, koncentrace, hustota, pH, viskozita atd. [20].

Katalog nanomateriálu, který je přístupný veřejnosti, obsahuje seznam všech nanomateriálů používaných v kosmetických přípravcích. Obsahuje seznam nanomateriálů, které jsou používány jako barviva, filtry ultrafialového záření a konzervační přísady. Katalog uvádí kategorie kosmetických přípravků včetně jejich předvídatelné podmínky expozice [3].

V kosmetice jsou používány nejrozsáhlejší nanomateriály, jako nanoemulze, nanogely nebo nanočástice. Z přírodního zdroje jsou získávány např. cyklodextriny, které nacházejí uplatnění jako stabilizátory nebo rozpouštědla. Mezi některé z využívaných nanočástic v kosmetice patří např. dendrimery, oxid zinečnatý (ZnO), oxid titaničitý (TiO₂), oxid křemičitý (SiO₂), oxid hlinitý (Al₂O₃), fluorid vápenatý (CaF₂), stříbro, měď a další. Kosmetické nanomateriály je možné rozdělit do několika kategorií. Patří sem např. organické nanočástice, kam spadají tekuté nanočástice, liposomy, nanosomy, niosomy, transferosomy, mikroemulze, nanoemulze, ultrasomy, photosomy, aquasomy. Další kategorie jsou anorganické nanočástice, kam spadá nanostříbro, nanozlato, oxid zinečnatý, oxid titaničitý, křemičité nanočástice.

V nanotechnologii kosmetiky jsou využívány také polymerní nanočástice, jako nanokapsule, hydrogely, chitosany, kapalné krystaly. Dále lze najít také nanočásticové systémy, kam patří nanokrystaly, nanovlákna, nanopigmenty [21, 22].

2.5 Nanostříbro

2.5.1 Nanostříbro v kosmetice

Nanočástice stříbra jsou v kosmetických přípravcích využívány hlavně kvůli jejich antimikrobiální aktivitě. Jelikož při využívání kosmetických produktů dochází ke kontaktu s částmi lidského těla, je velmi důležité chránit tyto produkty před potenciální kontaminací jakýmkoliv patogenními mikroorganismy, čehož se dosahuje přidáváním konzervačních (antimikrobiálních) látek do kosmetických produktů. Problém vyvstává hlavně v případě možné toxicity nanostříbra, které by mohlo proniknout přes kůži do těla a způsobit zdravotní problémy, případně poškodit orgány, viz kapitola 2.5.7 [23, 24].

Nanočástice mají jedinečné optické, tepelné, elektrické a magnetické vlastnosti. Využívané nanočástice stříbra tvoří asi 12 % všech využívaných nanočástic v kosmetice. Nanočástice stříbra jsou využívány v krémech určených k denní či noční aplikaci. Tyto krémy mají za účel udělat pokožku na pohled svěžejší. Stříbrné nanočástice lze nalézt např. také v pastách na zuby, případně v přípravcích na ústní hygienu. Koncentrace nanostříbra o hodnotě 0,004% se ukázala být efektivní v potlačování růstu bakterií, které způsobovaly nepříjemný zápach a zubní kazy [23, 24].

Nanočástice stříbra je možné nalézt ve velkém množství typů kosmetických přípravků. Nanostříbro je využíváno v mýdlech, mokřích ubrouscích, deodorantech, nejrůznějších produktech na rty, přidává se taktéž do obličejových a tělových pěn [23].

2.5.2 Syntéza nanočástic stříbra

Způsob, jakým syntetizovat nanočástice stříbra, je možné nalézt v mnoha literárních zdrojích [14, 24-31]. Nanostříbro je možné připravit fyzikálními, chemickými nebo biologickými metodami. Fyzikálních a chemických metod je velké množství, většina z nich je ale velice drahá nebo je třeba pracovat s toxickými látkami. Alternativní možností syntézy nanočástic je právě metoda biologická, která využívá ke tvorbě nanostříbra mikroorganismy a rostliny [14, 24].

Mezi nejvyužívanější způsoby přípravy nanočástic stříbra patří např. chemické a fotochemické redukce, tepelný rozklad, a stále více oblíbené biologické metody, využívající pro syntézu nanostříbra nejrůznější mikroorganismy [24].

Jednou z možných chemických syntéz nanostříbra je syntéza z AgNO_3 za použití směsi hydrátu hydrazinu, citronanu sodného a SDS (dodecyl sulfátu sodného), který slouží jako stabilizátor. Tento typ připraveného nanostříbra byl testován proti *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* a u všech vykazoval antimikrobiální účinek [32].

V roce 2006 Panáček a kol. [33] publikovali práci, ve které se zabývali syntézou nanočástic stříbra redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ pomocí čtyř sacharidů. Těmi byly dva monosacharidy (glukóza a galaktóza) a dva disacharidy (maltóza a laktóza). Při této syntéze byly použity různé koncentrace amoniaku ($0,005\text{--}0,20\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a různé hodnoty pH ($11,5\text{--}13,0$). Tímto způsobem dosáhli zisku široké škály částic různých velikostí, v rozmezí nanočástic ale i částic spíše již koloidních ($25\text{--}450\text{ nm}$). Distribuce dle velikosti byla ovšem omezená, hlavně v případě

nízkých koncentrací amoniaku. Při této studii bylo zjištěno, že struktura použitého sacharidu má vliv na velikost částic nanočistíbra. Při použití maltózy k redukci komplexu, vznikly nanočistice o velikosti průměrně 25 nm, které vykazovaly antimikrobiální a baktericidní účinky vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím [33].

Využívání biologických metod pro přípravu nanočistíbr stříbra je považováno za alternativní cestu syntézy vůči metodám chemickým a fyzikálním. Mezi výhody těchto metod patří hlavně menší nákladnost, šetrnější technologie a nízké procento využívaných syntetických chemikálií. Podle místa syntézy nanočistíbr dělíme přípravu do dvou kategorií na intra- a extracelulární. Využívání houby rodu *Verticillium* je jedním ze způsobů přípravy nanočistíbr biologickou metodou, další příklady viz. kapitola 2.5.4 [24].

2.5.3 Charakterizace nanočistíbr stříbra

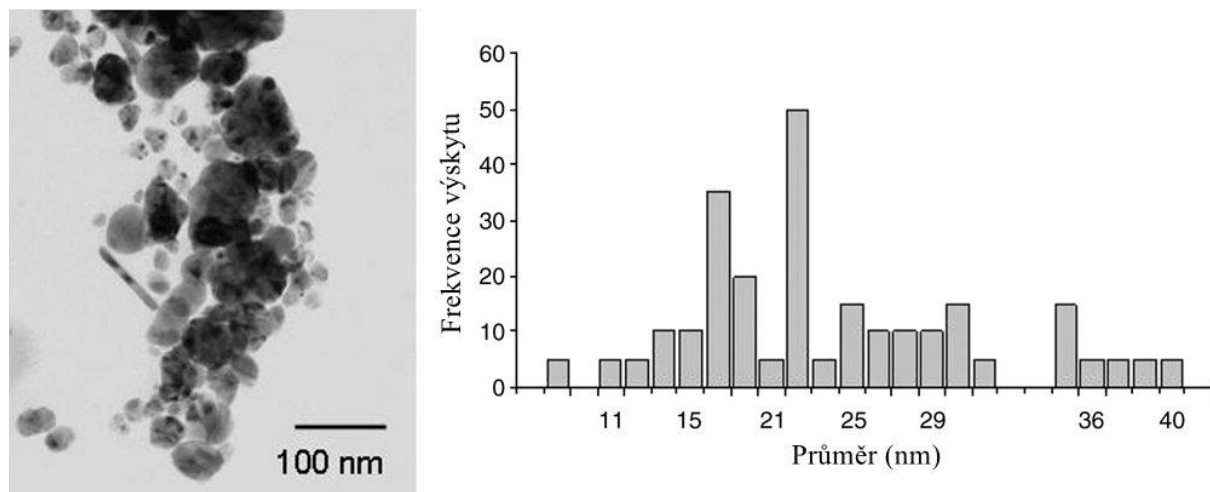
Stříbro ve formě nanočistíbr bylo poprvé zmíněno v článku [34] zaměřujícím se na elektronovou mikroskopii v roce 1949. Taktéž byly rozebírány otázky týkající se velikosti částí, jejich formy a distribuce. Účinky ale mohly být analyzovány pouze nepřímými metodami jako sedimentace nebo osmotický tlak [35].

Metody, kterými lze charakterizovat vzniklé nanočistice, je možné rozdělit do několika kategorií [20, 36]:

- Optické (obrázkové) metody,
 - Konfokální mikroskopie,
 - Skenovací mikroskopie v blízkém poli,
 - Dvou fotonová fluorescenční mikroskopie,
 - Dynamický rozptyl světla,
- Elektronové metody
 - Skenovací elektronová mikroskopie,
 - Elektronová mikroanalýza,
 - Transmisní elektronová mikroskopie,
 - Skenovací transmisní elektronová mikroskopie.
- Fotonové metody
 - Fotoelektronová spektroskopie,
 - UV-VIS spektroskopie,
 - Atomová absorpční spektroskopie,
 - Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem,
 - Fluorescenční spektroskopie,
 - Lokalizovaná povrchová plasmová rezonance (LSPR).
- Metody iontové
 - Rutherfordův zpětný rozptyl (RBS),
 - Rentgenová difrakce,
 - Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie.

Mezi techniky, kterými jsou analyzovány připravené nanočistice, patří UV spektrofotometrie. Mezi metody, kterými je sledována velikost, morfologie a složení nanočistíbr, patří např. Transmisní elektronová mikroskopie TEM (*Transmission Electron Microscopy*), Rentgenovou spektrometrií EDX (*Energy-dispersive X-ray Analysis*), Dynamický rozptyl

světla DLS (*Dynamic Light Scattering*) nebo Difrakce vysoko energetických elektronů HEED (*High-energy Electron Diffraction*). Při použití metody TEM je výsledkem histogram zaznamenávající distribuci velikostí částic, kdy jsou změřeny rozměry alespoň 50 částic. Příklad takového histogramu je možné vidět na obrázku 1. [14, 20, 32].



Obrázek 1.: TEM - pohled na nanočástice stříbra (vlevo) a distribuce částic dle velikosti (vpravo) [32]

2.5.4 Účinky nanostříbra na mikroorganismy

Antimikrobiální účinek stříbrných solí byl znám již v antice. V dnešní době je stříbro využíváno k omezení mikrobiálního růstu v mnoha odvětvích, jako medicína nebo kosmetika. Je známo, že stříbrné ionty a sloučeniny stříbra mají toxický účinek vůči mikroorganismům. Antimikrobiální účinek byl prokázán na mnoha druzích bakterií, včetně *E. coli* [14, 37].

Antimikrobiální účinek nanostříbra byl prokázán např. proti bakteriím *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphillis typhus* a *Staphylococcus aureus*. Studie provedená J. S. Kim a kol. [37] prokázala spojitost mezi volným radikálem uvolněným z povrchu nanostříbra a antimikrobiální aktivitou. Bylo dokázáno, že právě volný radikál uvolněný z nanočástice je zodpovědný za antimikrobiální účinky nanostříbra [14, 23].

Kromě antibakteriálního účinku bylo prokázáno, že nanočástice stříbra mají i fungicidní účinek. Byla sledována antifungální aktivita vůči *Trichophyton mentagrophytes* a vůči rodům *Candida* – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* a *C. krusei*. Kvasinky rodu *Candida glabrata* nebo *Candida albicans* jsou známé pro způsobující infekce v dutině ústní. Nanočástice stříbra rozrušují buněčnou strukturu hub, což vede ke zničení buňky [23].

Při studii, kterou provedl pan Lavakumar a kol. [38], byl pozorován antimikrobiální účinek nanostříbra vůči vybraným bakteriím. Pro syntézu nanočástic stříbra použili červenou řasu rodu *Gracilaria crassa*, kterou nechali reagovat s $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$. Byla sledována antimikrobiální aktivita u bakterie *Bacillus subtilis* při koncentraci nanostříbra 20 a $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po 24 hodinách inkubace byla potvrzena antimikrobiální aktivita připraveného nanostříbra na tuto bakterii [38].

Studie zaměřená na dezinfekční účinek nanostříbra na archeologické textilie byla provedena paní Katarzynou Pietrzak a kol. [39]. Cílem této studie bylo zjistit, zda nanostříbro bude schopné zničit bakterie a houby, přítomné v textiliích, přičemž nejdříve byly všechny přítomné mikroorganismy z textilií vyizolovány. Některé ze stanovovaných mikroorganismů byly

bakterie rodu *Bacillus*, *Kocuria rosea* a *Micrococcus luteus*. Jako dezinfekce byl použit koloidní roztok nanočástic stříbra o koncentraci $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Nanostříbro vykazovalo antimikrobiální účinek vůči většině izolovaných mikroorganismů. Pouze dva rody grampozitivních bakterií *Bacillus* a *Micrococcus* nebyly po použití dezinfekčního přípravku usmrceny [39].

Antimikrobiální aktivita nanostříbra byla také sledována u studie, kterou provedli Vivian Choong a kol. [40]. Pro výrobu nanostříbra byli použity endosymbionti hub (KDH5, VDN3B) vyizolovaní z orchidejí. Antimikrobiální aktivita byla sledována vůči několika mikroorganismům, např. u *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. U *S. marcescens* byla největší inhibiční zóna pozorována při použití poměru 1:5 (AgNO_3 :KDH5) a 1:1 (AgNO_3 :VDN3B), zatímco u *M. luteus* to byl poměr 1:1 (AgNO_3 :KDH5) a poměr 4:1 (AgNO_3 :VDN3B) [40].

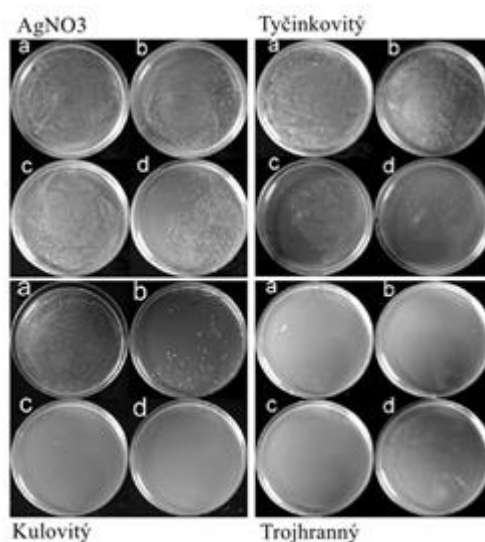
2.5.5 Velikost a koncentrace částic vzhledem k účinku

Účinnost nanočástic stříbra je dána jak tvarem, tak velikostí částic, přičemž platí, že čím menší jsou částice, tím vyšší mají antibakteriální efekt, což může být způsobeno rozlišnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které jsou spojené s rostoucí katalytickou aktivitou způsobenou větším aktivním povrchem malých částic. Zároveň, ale záleží také na způsobu přípravy nanočástic. Toto tvrzení bylo podpořeno studií Panáčka a kol. [33], která byla zaměřena na srovnání antimikrobiálních vlastností nanočástic stříbra. Výsledné hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) se lišily u jednotlivých nanočástic dle sacharidu, pomocí kterého byly syntetizovány. Koncentrace nanostříbra, která vykazovala antimikrobiální účinky byla v rozmezí $0,84\text{--}54 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. V případě nanočástic stříbra, připravené redukcí modifikovaným Tollensovým procesem, měly částice velikosti 25 nm redukované maltózou nejnižší hodnoty MIC, přesněji 1,69 až $13,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Naopak aktivita částic velikosti 50 nm redukovaných galaktózou byla mnohem nižší a hodnota MIC byla větší než $54 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, tedy byla potřeba mnohem větší koncentrace nanočástic o velikosti 50 nm, než u částic o velikosti 25 nm [13, 16, 23, 33].

Při stanovení antifungální aktivity nanostříbra, které provedli Panáček a kol. [33], byl pozorován lepší inhibiční účinek u kvasinek než u bakterií. Byly použity nanočástice stříbra velikosti 25 nm redukované maltózou a dále stabilizované povrchově aktivními látkami. Hodnoty MIC byly v rozmezí 0,1 až $1,69 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ [16, 33].

Studie, kterou provedli Guzman a kol. [32] se zaměřovala na sledování účinnosti nanočástic stříbra na různé bakterie. Bylo jimi dokázáno, že připravené nanočástice stříbra o průměru 9 ± 2 a 14 ± 5 nm měly nejvyšší hodnotu antibakteriální aktivity vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Naopak nejnižší aktivitu zaznamenali u částic s průměrem 30 ± 8 nm [32].

Další studií, kterou provedli Pal a kol. [41] byla opět potvrzena souvislost mezi velikostí částic a účinkem. Při této studii byly připraveny nanočástice z AgNO_3 o různém tvaru a velikosti a byl sledován jejich inhibiční účinek na růst *E. coli* [41].



Obrázek 2.: Petriho misky s 10^7 CFU/ml *E. coli* inkubovány s různými formami nanočástic stříbra [41]

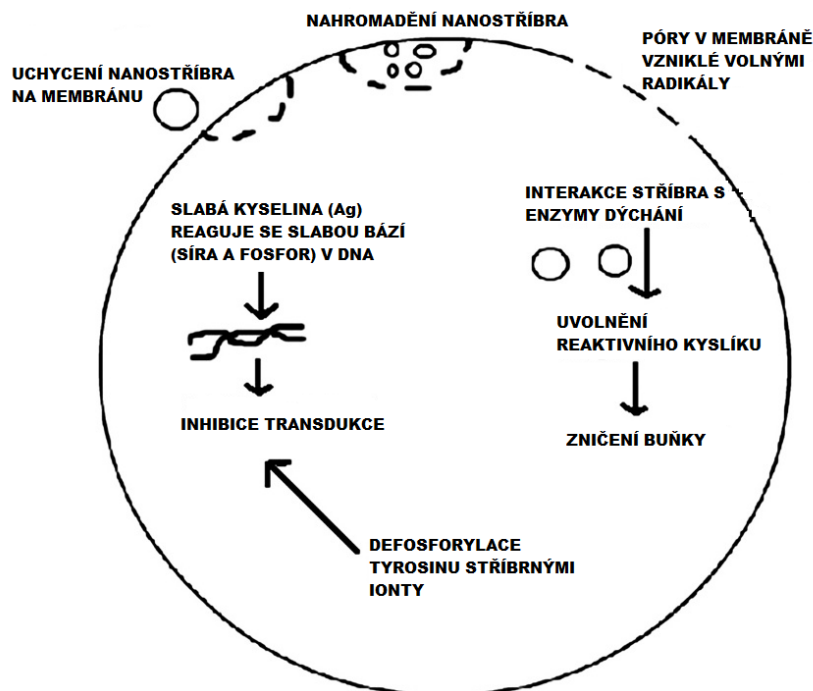
Na Obrázku 2. je možné vidět Petriho misky s koloniemi *E. coli*, které jsou inhibovány přítomností nanostříbra. Je možné vidět, že u různých tvarů nanočástic je inhibice růstu bakterie rozdílná. Na miskách a, b, c a d jsou různá množství nanočástic, přesněji 1; 12,5; 50 a 100 μg . Na prvních čtyřech miskách, které obsahují pouze AgNO_3 lze vidět, že nedochází k inhibici růstu nehledě na množství částic. U nanočástic s tyčinkovitým tvarem lze pozorovat o něco lepší inhibici než u AgNO_3 , stále ale na všech Petriho miskách dochází k růstu bakterie. U kulovitého tvaru nanočástic je možné na miskách s 1 a 12,5 μg nanočástic pozorovat růst bakterie, ale u misek s 50 a 100 μg je inhibice růstu již 100%. U posledních misek s trojhranným tvarem částic lze inhibici růstu pozorovat na všech miskách nehledě na množství [41].

Při studii, kterou provedli Jun Sung Kim a kol. [37] byly pozorovány u použitých bakterií a kvasinek různé inhibiční účinky nanočástic stříbra. Koncentrace nanostříbra, kterou použili, byla v rozmezí 0,2 až 33 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U kvasinek byla stanovena hodnota MIC mezi 6,6–13,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U *E. coli* byl pozorován nejlepší inhibiční účinek a hodnota MIC byla stanovena na hodnotu mezi 3,3–6,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U bakterie *S. aureus* však nebyla pozorována významná inhibice ani u nejvyšší použité koncentrace nanočástic, tedy hodnota MIC je u této bakterie větší než 33 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [37].

2.5.6 Mechanismus účinků nanostříbra

V současné době je známo několik teorií a možných způsobů antimikrobiálních účinků nanostříbra. Jeden z možných mechanismů účinků je popsán tak, že nanočástice stříbra jsou uchyceny na buněčnou membránu bakterie, přes kterou následně proniknou do nitra bakteriální buňky. Nanostříbro pak zabíjí bakteriální buňky tím, že změní strukturní vlastnosti buňky, jako např. propustnost buněčné stěny, která je následována jejím zničením. Dalším možným mechanismem účinku je vznik volných radikálů nanostříbra, které při styku s mikroorganismy způsobují poškození buněčné stěny tak, že v ní vytvoří póry, což vede k následnému usmrcení buňky. Dalším příkladem je uvolnění stříbrných iontů, které při proniknutí do buňky způsobují inhibici buněčných funkcí, a mohou tak způsobovat její

poškození. Mezi mechanismy patří také ovlivnění enzymů dýchání stříbrnými ionty uvolněnými z nanostříbra, které reagují s thiolovou skupinou enzymu. Dále mohou nanočástice stříbra reagovat se sírou nebo fosforem vázaným v DNA řetězci, což může vést k problémům např. při transdukci DNA. Na *obrázku 3.* je možné vidět schéma obsahující některé z uvedených mechanismů [14, 23, 42].



Obrázek 3.: Modely mechanismů nanočástic stříbra na buňku bakterie [14]

2.5.7 Toxicita nanostříbra

Studii, kterou provedli S. Kokura a kol. [6], zaměřenou na pronikání nanočástic stříbra přes kůži, bylo dokázáno, že v kosmetických přípravcích v dnešní době využívaných, není nanostříbro schopné proniknout přes kůži, avšak v případě, kdy je kůže porušená můžeme pozorovat 0,2% až 2% prostup nanočástic stříbra o koncentraci 0,002 až 0,02 mg·l⁻¹. Koncentrace nanočástic stříbra byla stanovena pomocí atomové emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*). Zároveň ale tato množství prošlých nanočástic nevykazovala žádnou toxicitu, což bylo dokázáno stanovením metodou fluorescenční mikroskopie (*Fluorescent Microscopy*), přičemž ke stanovení byly použity barevné látky Hoechst 33342 a propidium jodid PI (*Propidium Iodide*). Nanočástice o velikosti 20 až 200 nm nejsou schopné proniknout přes kůži, a to ani přes její poškozenou část. Nanočástice menší než 10 nm byly schopné proniknout do hlubších vrstev kůže, částice větší než 40 nm byly schopné proniknout pouze do hloubky 5–8 μm, tedy maximálně do svrchní vrstvy kůže neboli pokožky (*dermis*) [6, 23].

Nanočástice stříbra ovšem nějakou formu toxicity vykazují. Byly provedeny testy na eukaryotických buňkách, kde byla potvrzena cytotoxicita nanostříbra při koncentracích vyšších než 30 mg·l⁻¹. Roztok dusičnanu stříbrného vykazoval cytotoxicitu již při koncentraci 1 mg·l⁻¹. Výsledky jsou uváděly v tzv. LC₅₀, která udává koncentraci látky potřebné k usmrcení 50 % organismů. Dalším příkladem studia toxicity, byl test akutní toxicity na trepce velké, kdy

výsledky byly udány v LC_{50} za hodinu. Při tomto testu nanostříbro nevyvolalo akutní toxicitu ani při koncentraci $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Iontové stříbro se projevilo akutní toxicitou a usmrtilo všechny testované trepy velké již při koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [16].

Při studii, kterou provedli Kim a kol. [43], byla studována akutní toxicita nanočástic stříbra. Účinkům nanostříbra byla vystavena laboratorní krysa, přičemž stanovily LD_{50} na hodnotu vyšší než $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Zároveň ale nepozorovali žádné známky toxicity ani úmrtnosti při použití nižší dávky blízko této hodnoty [43].

2.6 Přehled kosmetických surovin s obsahem stříbra

Sloučeniny stříbra se v kosmetice využívají k několika účelům, např. jako barvivo, konzervační látka nebo antimikrobiální přísada. Jaké suroviny s obsahem stříbra pro výrobu kosmetických přípravků je možné použít, nebo spíše jaké suroviny jsou zakázané, případně omezené, se zaměřuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009, které pojednává o kosmetických přípravcích [3].

Seznam surovin s obsahem stříbra [3, 44, 45, 70]:

1. INCI: **2-Hydroxy-Silver(1+) Salt**

- Chemický název, název dle IUPAC: Sůl 2-hydroxystříbrná,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: 460-890-5,
- Použití: neregistrováno,
- Regulace: (EU) No 866/2014,
- Omezení: Maximální povolená koncentrace stříbra 0,0024 %. Zákaz používání v přípravcích určených k ústní hygieně a v přípravcích na oči.

2. INCI: **CI 77820**

- Chemický název, název dle IUPAC: Stříbro,
- Číslo dle CAS: 7440-22-4,
- Číslo dle EC: 231-131-3,
- Použití: Barvivo – bílá barva,
- Regulace: 88/667/EEC,
- Kritérium: Čistota dle směrnice Komise 95/45/ES (E 174).

3. INCI: **Silver Nitrate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Dusičnan stříbrný,
- Číslo dle CAS: 7761-88-8,
- Číslo dle EC: 231-853-9,
- Použití: Barvení řas a očí,
- Regulace: 84/415/EEC,
- Omezení: Maximální povolená koncentrace dusičnanu stříbrného v kosmetickém přípravku je 4 %. Na obalu kosmetického přípravku musí být uvedeno, že přípravek obsahuje tuto látku. Dále musí být uvedeno varování: „Při zasažení očí okamžitě vypláchněte vodou.“

4. INCI: ***Silver Lactate***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Laktát stříbrný,
 - Číslo dle CAS: 15768-18-0,
 - Číslo dle EC: 239-859-3,
 - Použití: Deodorant.
5. INCI: ***Ammonium Silver Zeolite***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Zeolit amonno-stříbrný,
 - Popis přípravy: Produkt reakce dusičnanu stříbrného se zeolitem,
 - Číslo dle CAS: neregistrováno,
 - Číslo dle EC: neregistrováno,
 - Použití: Absorbent a deodorant.
6. INCI: ***Silver Copper Zeolite***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Zeolit stříbrno-měďnatý,
 - Popis přípravy: Produkt reakce zeolitu s dusičnanem stříbrným a dusičnanem měďnatým,
 - Číslo dle CAS: 130328-19-7,
 - Číslo dle EC: neregistrováno,
 - Použití: Absorbent a deodorant.
7. INCI: ***Sodium Silver Aluminium Silicate***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Křemičitan sodno-stříbrno-hlinitý,
 - Popis přípravy: Produkt reakce křemičitanu sodného s hlinitanem sodným ve vodném prostředí dusičnanu sodného, hydroxidu sodného a dusičnanu stříbrného,
 - Číslo dle CAS: neregistrováno,
 - Číslo dle EC: neregistrováno,
 - Použití: Absorbent a deodorant.
8. INCI: ***Ammonium Silver Zinc Aluminium Silicate***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Křemičitan amonno-stříbrno-zinečnato-hlinitý,
 - Popis přípravy: Křemičitan vzniklý reakcí dusičnanu zinečnatého, dusičnanu amonného a dusičnanu stříbrného se zeolitem,
 - Číslo dle CAS: 130328-20-0,
 - Číslo dle EC: 603-404-0,
 - Použití: Absorbent, deodorant, konzervační látka.
9. INCI: ***Silver Benzoate***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Benzoát stříbrný,
 - Číslo dle CAS: 130328-20-0,
 - Číslo dle EC: 603-404-0,
 - Použití: Absorbent, deodorant, konzervační látka.
10. INCI: ***Silver Citrate***
 - Chemický název, název dle IUPAC: Citrát stříbrný,
 - Číslo dle CAS: 36701-38-9,
 - Číslo dle EC: neregistrováno,
 - Použití: Antimikrobiální přísada a deodorant.

11. INCI: **Silver Titanium Carbide**

- Chemický název, název dle IUPAC: Karbid stříbrno-titaničitý,
- Popis přípravy: Produkt spalování karbidu titaničitého, oxidu titaničitého a stříbra,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada, deodorant, ústní hygiena, přísada proti tvoření zubního plaku.

12. INCI: **Colloidal Silver**

- Chemický název, název dle IUPAC: Koloidní stříbro,
- Popis přípravy: Suspenze stříbrných částic ve vodě připravená pomocí elektrolýzy,
- Číslo dle CAS: 7440-22-4,
- Číslo dle EC: 231-131-3,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

13. INCI: **Silver Chloride**

- Chemický název, název dle IUPAC: Chlorid stříbrný,
- Číslo dle CAS: 7783-90-6,
- Číslo dle EC: 232-033-3,
- Použití: Konzervační přísada,
- Regulace: 96/41/EC,
- Omezení: Tato sloučenina se může používat pouze při zakotvení na oxidu titaničitém. Maximální povolená koncentrace chloridu stříbrného je 0,004 %. Je zákaz používání chloridu stříbrného v přípravcích pro děti do 3 let, v přípravcích určených k ústní hygieně a v přípravcích na oči a rty.

14. INCI: **Indium Silver Zinc Diethyldithiocarbamate Nitrate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Diethyldithikarbamat-dusičnan indnito-stříbrno-zinečnatý,
- Popis přípravy: Komplex vzniklý reakcí dusičnanu zinečnatého, dusičnanu stříbrného, dusičnanu inditého s diethyldithiocarbonátem sodným,
- Číslo dle CAS: 532-31-0,
- Číslo dle EC: 208-533-2,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

15. INCI: **Silver Acetylmethionate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Acetylmethionát stříbrný,
- Číslo dle CAS: 105883-46-3,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

16. INCI: **Silver Sulfate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Síran stříbrný,
- Číslo dle CAS: 10294-26-5,
- Číslo dle EC: 233-653-7,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

17. INCI: **Silver Oxide**

- Chemický název, název dle IUPAC: Oxid stříbrný,
- Číslo dle CAS: 20667-12-3,
- Číslo dle EC: 243-957-1,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

18. INCI: **Sodium Calcium Silver Phosphate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Fosforečnan sodno-vápenato-stříbrný,
- Popis přípravy: Produkt štěpení oxidu sodného v přítomnosti oxidu vápenatého, oxidu stříbrného a oxidu fosforečného,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

19. INCI: **Sodium Magnesium Silver Phosphate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Fosforečnan sodno-hořečnato-stříbrný,
- Popis přípravy: Produkt štěpení oxidu sodného v přítomnosti oxidu hořečnatého, oxidu stříbrného a oxidu fosforečného,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada.

20. INCI: **Silver Magnesium Aluminium Phosphate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Fosforečnan stříbro-hořečnato-hlinitý,
- Popis: Produkt reakce oxidu stříbrného s oxidem fosforečným, oxidem hořečnatým a oxidem hlinitým,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada a přísada ke snížení objemové hmotnosti.

21. INCI: **Silver Borosilicate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Borosilikát stříbrný,
- Popis přípravy: Produkt reakce oxidu stříbrného s oxidem boritým, oxidem křemičitým a oxidem sodným,
- Číslo dle CAS: neregistrováno,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antimikrobiální přísada, tělový kondicionér.

22. INCI: **Silver Bicarbonate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Hydrogenuhličitan stříbrný,
- Číslo dle CAS: 534-16-7,
- Číslo dle EC: 208-590-3,
- Použití: Antimikrobiální přísada, přísada proti lupům.

23. INCI: **Silver Carboxymethylalaninate**

- Chemický název, název dle IUPAC: Karboxymethylalaninát stříbrný,
- Číslo dle CAS: 1632046-27-5,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Příklad přísady proti lupům.

24. INCI: *Silver Hydroxide*

- Chemický název, název dle IUPAC: Hydroxid stříbrný,
- Číslo dle CAS: 12673-77-7,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Antioxidant a tělový kondicionér.

25. INCI: *Silver Salicylate*

- Chemický název, název dle IUPAC: Salicylát stříbrný,
- Popis přípravy: Produkt reakce stříbrné soli s kyselinou salicylovou,
- Číslo dle CAS: 19025-97-9,
- Číslo dle EC: neregistrováno,
- Použití: Ochranná přísada proti UV záření.

2.6.1 Chlorid stříbrný (INCI: *Silver Chloride*)

Chlorid stříbrný, molekulární vzorec AgCl, se v kosmetice používá jako konzervační látka. Z hlediska bezpečnosti je klasifikován jako nebezpečná látka, a to dle Nařízení (ES) č. 1272/2008. Při inhalaci prášku v rozptýleném stavu má dráždivé účinky na dýchací orgány. Při opakované nebo dlouhodobé expozici (2–25 let), při vdechnutí nebo polknutí může způsobovat argyrii (otrava stříbrem). Dále je akutně nebezpečný pro vodní prostředí. Je vysoce toxický pro vodní organismy, a to s dlouhodobými účinky. Mezi bezpečnostní pokyny při manipulaci s touto látkou patří zamezení vdechnutí, v případě, kdy by došlo ke vdechnutí, je doporučeno vynést postiženého na čerstvý vzduch [46-48].

Chlorid stříbrný je za normálních podmínek stálý a nereaktivní. V případě požáru vyvstává riziko vzniku nebezpečných zplodin např. chlorovodíku (HCl). Při hašení nesmí použita voda vniknout do kanalizace nebo vodních toků. Při zacházení a skladování chloridu stříbrného není třeba zvláštních preventivních opatření. Je třeba avšak uchovávat tuto látku odděleně od potravin, nápojů a krmiv. Skladování musí být na suchém místě a chráněno před slunečním zářením a vlhkostí, při doporučených teplotách 15–25 °C. Při nakládání s chemikálií je třeba dbát ochrany očí, obličeje, rukou. Při přepravě musí být označen jako „UN3077, LÁTKA OHROŽUJÍCÍ ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ, TUHÁ, J.N., (Chlorid stříbrný), 9, III“ [46-48].

U chloridu stříbrného nebyla prokázána akutní, subakutní ani chronická karcinogenita, mutagenita, toxicita pro reprodukci. LD₅₀ pro potkana při ústním podání činilo více jak 5,000 mg·kg⁻¹. Chlorid stříbrný není a nesmí být klasifikován jako akutně toxický pro vodní organismy [46-48].

– LC ₅₀ , 96 hod., ryby (<i>Pimephales promelas</i>)	0,0049 mg·l ⁻¹
– LC ₅₀ , 48 hod., bezobratlí	0,00022 mg·l ⁻¹ .
– EC ₅₀ , 48 hod., dafnie (<i>D. magna</i>)	0,0015 mg·l ⁻¹
– IC ₅₀ , řasy (<i>M. aeruginosa</i>)	od 0,0007 mg·l ⁻¹
– IC ₅₀ , řasy (<i>Sc. quadricauda</i>)	od 0,009 mg·l ⁻¹
– EC ₅₀ , prvoci (<i>U. pardusci</i>)	od 0,1 mg·l ⁻¹
– EC ₅₀ , bakterie (<i>Ps. putida</i>)	od 0,0006 mg·l ⁻¹

Metody přípravy nanočástic chloridu stříbrného:

Nerozpustnost AgCl ve vodě se ukázala být problémovou právě při přípravě nanočástic stříbra z této sloučeniny. AgCl je možné získat z elektronického kovového odpadu pomocí

vyluhování v chemických sloučeninách jako např. kyselině dusičné nebo kyselině chlorečné. Tímto způsobem je možné získat velice čistý AgCl. K takto vyizolovanému AgCl je přidán amoniak a je vytvořen roztok $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, ze kterého jsou nanočástice stříbra vyredukovány pomocí hydrazinu při laboratorní teplotě [49].

Pro výrobu nanočástic AgCl jsou využívány fyzikální i chemické metody, jako chemická redukce, ultrazvukové ozáření nebo elektrospinning. Tyto metody požadují speciální teplotní a tlakové podmínky, zároveň je třeba často pracovat s biologicky nebezpečnými látkami [50].

Nanočástice stříbra je možné syntetizovat také biologickou cestou. Syntéza nanočástic AgCl byla provedena pomocí mikrořasy *Chlorella vulgaris*, která byla inkubována na médiu obsahujícím AgNO_3 , přičemž vytvoření nanočástic se projevilo změnou barvy média. Nanočástice byly z média izolovány a purifikovány pomocí centrifugace a stabilizovány citrátem sodným v destilované vodě [50].

2.6.2 Sírán stříbrný (INCI: *Silver Sulfate*)

Sírán stříbrný má molekulární vzorec Ag_2SO_4 a v kosmetice nachází využití jako antimikrobiální přísada. Dle nařízení (ES) č. 1272/2008 je klasifikován jako nebezpečná látka. Sírán stříbrný způsobuje závažné poškození očí, dále je vysoce toxický pro vodní organismy, a to s dlouhodobými účinky. Může hrozit trvalé poškození zabarvení rohovky. Tato látka má dráždivé účinky, způsobuje kašel, dušnost nebo střevní potíže. V případě vážného zasažení látkou je nutné vyhledat lékařskou pomoc. Sírán stříbrný je za běžných podmínek skladování nereaktivní a stabilní. Je třeba dbát opatrnosti při reakcích se silnými oxidačními činidly. Při hoření se mohou uvolňovat nebezpečné výpary např. oxidy síry, v případě hašení je toto nutné zohlednit. Při manipulaci je nezbytné zabránit kontaminaci povrchových a podzemních vod a půd, jelikož se tato látka nesmí dostat do kanalizací. Zbytky látky a kontaminované vody nesmí být vypouštěny do půdy, veřejné kanalizace, do blízkostí vodních zdrojů a vodotečí. Skladování síranu stříbrného musí být prováděno v těsně uzavřených obalech na suchém, chladném (max 25 °C) a dobře větraném místě. Je důležité chránit jej před světlem. Při přepravě je látka označována jako „LÁTKA OHROŽUJÍCÍ ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ, TUHÁ, J.N. (SÍRAN STŘÍBRNÝ)“ [51-53].

Toxikologické informace [51-53]:

- LD50 orálně u potkana 5 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
- LC50 96 hodin, ryby 0,0049 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
- EC50 48 hodin, dafnie 0,0015 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

2.7 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Metody stanovení citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky, tedy jejich rezistence vůči těmto látkám, je možné rozdělit na semikvantitativní a kvantitativní metody [54].

2.7.1 Semikvantitativní metody

Tento typ metod se nejčastěji vyskytuje při základním stanovování citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Do této kategorie je možné zařadit např. diskovou difúzní metodu nebo agarovou difúzní metodu [54].

Disková difúzní metoda se nejvíce využívá pro stanovení rychle rostoucích, nenáročných bakterií. Vyhodnocení výsledků je prováděno měřením velikosti inhibičních zón, které vznikají v okolí disků s přítomnou antimikrobiální látkou. Dle velikosti vzniklé inhibiční zóny jsou mikroorganismy rozděleny na citlivý (S), středně rezistentní (I) a rezistentní (R) vůči použité antimikrobiální látce. Stanovení touto metodou je prováděno tak, že pevné živné médium je zaočkováno testovaným mikroorganismem o vhodném ředění. Na povrch takto připraveného média jsou položeny papírové disky, které jsou napuštěny antimikrobiální látkou. Následně dochází ke kultivaci mikroorganismů, přičemž se postupně inhibují, a to díky přítomnosti antimikrobiální látky, která je pomalu rozpouštěna a difundována do živného média [54, 55].

Agarová (Jamková) difúzní metoda má obdobný princip jako metoda disková, avšak místo pokládání disků se přímo do vrstvy agaru korkovrtem hloubí malé jamky, do kterých je pipetován vzorek antimikrobiální látky. Vyhodnocení je také stejné jako u diskové metody, dochází tedy ke měření velikosti inhibiční zóny [54, 55].

2.7.2 Kvantitativní – diluční metody

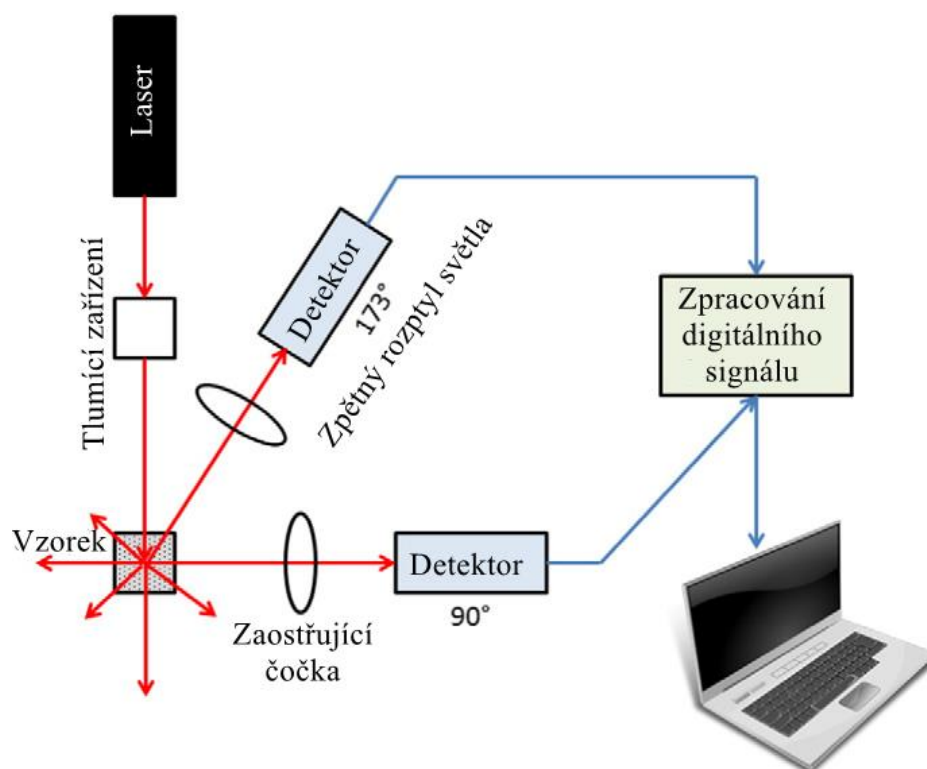
Tento typ metod je zaměřen na stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC popisuje nejnižší testovanou koncentraci daného antibiotika, které již viditelně inhibuje růst mikroorganismů. Hodnota MIC se nejčastěji vyjadřuje v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Testované mikroorganismy jsou pak podle velikosti hodnoty MIC označeny jako citlivé (S), středně rezistentní (I) a rezistentní (R) vůči danému antibiotiku [54].

Stanovení je prováděno na agarových případně bujónových půdách a do nich je zaočkováno standardní inokulum testovaného mikroorganismu. V této kategorii můžeme nalézt metody jako např. agarová diluční metoda, diluční mikrometoda nebo E-test [54].

2.8 Metody charakterizace částic

2.8.1 Stanovení velikosti částic – DLS

Jeden z důležitých parametrů charakterizující nanočástic je jejich velikost, přičemž jako nanočástice pokládáme částice o velikost 1-100 nm. Dynamický rozptyl světla DLS (*Dynamic Light Scattering*) je metoda zaměřující se na měření velikosti částic a molekul ve formě suspenze. Metoda je založená na měření rychlosti částic, které podléhají Brownovu pohybu, který je způsobený náhodnými srážkami s molekulami rozpouštědla. Rychlost tohoto pohybu je ovlivněna několika parametry, jako např. velikostí částic, viskozitou vzorku nebo teplotou. Pokud necháme vzorek osvětlovat monochromatickým světlem, např. laserem, dochází ke změně vlnové délky tohoto procházejícího světla, dochází k tzv. Dopplerovu jevu. Změna této vlnové délky je pak úměrná velikosti částic vzorku, dále také poskytne informace o rozložení, tvaru a struktuře částic. Instrumentální sestavení této metody lze vidět na *obrázku 4*. [36, 56, 57].



Obrázek 4.: Instrumentace metody DLS [57]

Metoda DLS poskytuje také hodnotu polydisperzního indexu PDI. Jako polydisperzní systém se označuje disperzní soustava, která obsahuje částice různých velikostí, není tedy jednotná ve velikosti částic a liší se tak od monodisperzního systému. PDI vykresluje intenzitu změny vlnové délky světla po dopadu na frakce částic o různé velikosti a ta je zaznamenána v podobě píků. Hodnota PDI nižší nebo rovna 0,1 se připisuje silně monodisperzním systémům, zatímco hodnoty PDI v rozmezí 0,1 až 0,4 a vyšší jsou považovány za mírně až vysoce polydisperzní [57].

2.8.2 Stanovení zeta potenciálu

Zeta potenciál, někdy označovaný jako elektrokinetický potenciál, je potenciál, který je možné pozorovat u koloidních systémů. Zjednodušeně lze zeta potenciál popsat jako rozdíl potenciálů mezi mobilní vrstvou částic a stacionární vrstvou částic. Zeta potenciál je závislý na několika faktorech, mezi nimiž je např. pH vzorku, iontová síla, koncentrace nebo teplota [58].

Zeta potenciál nám udává hodnotu tzv. krátkodobé nebo dlouhodobé stability emulzí. Pokud mají částice vysoký zeta potenciál, nezáleží na tom, zda kladný nebo záporný, jsou považovány za elektricky stabilní. Stabilita je u částic s vyšším potenciálem způsobena také převažujícími odpuzivými silami nad silami přitažlivými. Naopak u částic s nízkým zeta potenciálem může docházet ke koagulaci částic nebo vločkování, které jsou zodpovědné za snížení stability [57, 58].

Nanočástice s hodnotou zeta potenciálu v rozmezí $\pm 0-10$ mV jsou považovány za velmi nestabilní, u hodnot $\pm 10-20$ mV už je možné hovořit o relativně stabilních částicích, v rozmezí hodnot $\pm 20-30$ mV jsou částice považovány za středně stabilní a u hodnot zeta potenciálu nad ± 30 mV již mluvíme o částicích vysoce stabilních. Jako prahová hranice aglomerace

jsou považovány hodnoty zeta potenciálu v rozmezí -11 až -20 mV. Zatímco částice s hodnotou zeta potenciálu v rozmezí -41 až -50 mV jsou považovány za dobře stabilní [57, 58].

2.8.3 UV-VIS spektroskopie

UV spektroskopie je metoda absorpční spektroskopie, kde se využívá absorpce světla molekulami, v UV oblasti o vlnové délce 200–400 nm. Absorpce záření se projeví excitací elektronů ze základní hladiny do energeticky vyšší hladiny. Energie přijatá ze záření odpovídá rozdílu energií mezi základní a excitovanou hladinou [36].

Absorpční spektroskopie využívá elektromagnetické záření o vlnové délce 190–800 nm, kde se nachází UV a viditelné světlo. UV-VIS spektroskopie nalézá uplatnění hlavně v analytické chemii. Zde je využívána ke kvantitativním stanovením analytů, jako jsou kovové ionty, vysoce konjugované organické sloučeniny a biologické makromolekuly [36].

UV-VIS spektroskopie se ale využívá také ke stanovení velikosti a koncentrace nanočástic. Touto metodou je možné určit rozsah agregace částic nebo je možné ji využít při sledování stability nanočásticových systémů. Destabilizace nanočásticového systému se projeví snížením intenzity původního píku, jeho rozšířením, případně vytvořením druhého píku při vyšší vlnové délce, což je také signálem agregace [36].

2.9 Mikroorganismy použité na sledování antimikrobiální aktivity

2.9.1 Rod *Serratia*

Rod *Serratia* patří mezi čeledi *Enterobacteriaceae*, kam patří např. také rody jako *Escherichia* nebo *Salmonella*. I když patří tedy do čeledi enterobakterie, způsobem života se spíše podobá gramnegativním nefermentujícím tyčinkám. Tvoří tyčinky bílých, růžových nebo červených kolonií. Za aerobních podmínek při teplotě v rozmezí 12–36 °C tvoří červený pigment zvaný prodigiosin. Při anaerobní kultivaci na Fornetových miskách se používá k eliminaci vzdušného kyslíku. Jsou schopny vzdorovat dezinfekci a jsou nozokominálními patogeny. Často tvoří pigmenty, které jsou schopné je chránit před sluncem [59–61].

Nejčastěji roste při teplotě 12–36 °C, přičemž optimum růstu se nachází v rozmezí teplot 25–30 °C. Vyskytuje se na rostlinách, v půdě, v trávicím traktu hmyzu. Je zodpovědná za kažení potravin. Některé druhy mohou být zodpovědné za infekce, hlavně např. infekce dýchacích cest, přičemž léčba může být dosti náročná, jelikož bakterie tohoto rodu bývají rezistentní vůči ampicilinu [59, 61].

2.9.2 Rod *Bacillus*

Bakterie rodu *Bacillus* patří mezi grampozitivní bakterie tvořící sporulující tyčinky a koky, ať už aerobní nebo fakultativně anaerobní. *B. cereus* patří mezi bakterie mezofilní a *B. subtilis* mezi bakterie termofilní. Tento rod má schopnost tvořit jednu endosporu a sporulace probíhá pouze v přítomnosti kyslíku. Mají v zásobě nejrozličnější enzymy, kterými jsou schopny rozkládat mnoho organických sloučenin. Jsou schopny štěpit bílkoviny za vzniku amoniaku, redukovat sacharidy a dusičnan [59–62].

Růst probíhá při různých optimálních a maximálních teplotách. Tyto teploty se různí jak mezi druhy, tak mezi kmeny jednoho druhu. Dobře rostou při pH v rozmezí 5,5 až 8,5 [38].

Nejčastěji se vyskytují v půdě, v potravinách, které rozkládají, v tepelně upravených a následně nedostatečně chlazených jídlech a v dlouho uchovávaném chlazeném pastеровaném mléku. Některé druhy rodu *Bacillus* mají průmyslové využití, jiné jsou naopak patogenní. Bakteriální amylázy získané z *B. subtilis* jsou využívány např. v pivovarnictví nebo v textilním průmyslu. Proteinázy naopak naleznou využití v pracích prostředcích. *B. cereus* je schopný při růstu na polysacharidovém substrátu vylučovat toxiny, které mohou způsobovat otravy. Nejčastějším druhem substrátu bývají potraviny obsahující obiloviny nebo škrob [59, 60].

2.9.3 Rod *Micrococcus*

Patří mezi grampozitivní přísně aerobní bakterie. Tvoří balíčky nebo shluky buněk, často také nepravidelně uspořádané koky, v některých případech gramlabilní, barvy žluté, oranžové až červené. Bakterie rodu *Micrococcus* jsou schopné redukovat dusičnan. Je schopný pomalu ztekucovat želatinu. Velmi dobře roste na agarových médiích. Mírně okyseluje glukózový bujón [59, 60].

Roste i při teplotě 10 °C, optimální teplota je ale 20–25 °C. Při teplotě 45 °C již není schopný růstu. Bakterie rodu *Micrococcus* jsou schopné růstu i v přítomnosti 5% NaCl. Vyskytuje se v potravinách, hlavně ve slaných, v mléce, v půdě, ve vodě, v prachu, dále také na nářadí a zařízeních. Ve většině případů jsou nepatogenní, u slabších jedinců mohou způsobit zdravotní problémy [59–61].

2.9.4 Rod *Kocuria*

Patří mezi enterobakterie, tedy bakterie tvořící grampozitivní koky, které jsou striktně aerobní. Nejčastěji tvoří páry koků, případně tetrády nebo nepravidelné shluky. Dříve patřila *Kocuria* jako druh pod rod *Micrococcus*, od roku 1995 je již považována za samostatný rod. Nejznámější zástupci tohoto rodu jsou *K. rosea*, která tvoří červené kolonie, od čehož byl odvozen i její název *rosea* znamenající červený, dále také k tomuto rodu patří *K. marina*, *K. rhizophila* a *K. varians* [61, 63, 64].

Řadí se mezi příslušníky kožní flóry, ale má minimální klinickou důležitost. Velice vzácně mohou vyvolávat infekce, a to zejména u lidí se sníženou nebo nepřítomnou imunitou. Případy výskytu nakažení touto bakterií jsou spojené s pacienty trpícími nemocemi jako rakovina, porucha metabolismu nebo cukrovka. Nejčastěji jsou zodpovědné za kontaminaci laboratorního materiálu [61, 63].

2.9.5 Rod *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* jsou morfologicky velmi různorodé. Rozmnožují se multilaterálním pučením a tvoří na vhodných půdách pseudomycelium až pravé mycelium. Blastospory jsou tvořeny nejčastěji na pravém mycéliu. Rod *Candida* zahrnuje kvasinky, které nejsou schopny kvašení, ale také druhy, které mají silné kvasné schopnosti. [59, 60, 62].

Některé druhy tohoto rodu, jako např. *Candida utilis*, jsou využívány k tvorbě krmného droždí, které je vyráběno z melasy i dalších různých odpadních produktů [60].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- Laboratorní váhy – Scaltec SPO61, Heiligenstadt, spol. s.r.o., Německo,
- Vortex – IKA MS 3 basic, Německo,
- Autokláv – Vaposteri, BMT, Brno, ČR,
- Inkubátor – IP100-U, Biotech, Praha, ČR,
- Nanofotometr UV-VIS – IMPLEN, Německo,
- ZetasizerNano ZS, Malvern, Velká Británie,
- Mikropipety, pipety nedělené, Petriho misky, korkovrty, klička, zkumavky.

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Destilovaná voda,
- Glukóza, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR,
- Pepton, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR,
- Kvasničný extrakt, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR,
- Nutrient Broth, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR,
- Agar powder, Bacteriological, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR,
- Malt Extract Agar Base, Mycological Peptone, Himedia, Čaderský-Envitek, spol s.r.o., ČR.

3.3 Přípravky a suroviny použité ke stanovení antimikrobiální aktivity

Na stanovení antimikrobiální aktivity byly použity dva vzorky obsahující nanostříbro. Byl použit přípravek PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm, více informací v kapitole 3.3.2. Dále byl použit ke stanovení VIPOSILVER, který slouží jako surovina pro výrobu přípravků s obsahem stříbra, více informací v kapitole 3.3.1.

Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm bylo použito 100%, nebylo tedy nijak dále ředěno. Surovina Viposilver byla ředěna a použita na stanovení antimikrobiální aktivity v 1% a 50% koncentraci.

Tabulka 1.: Přehled vzorků s obsahem stříbra a použitá koncentrace

Použité vzorky	Koncentrace (%)
PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm	100
Viposilver	1
Viposilver	50

3.3.1 Viposilver

Viposilver je surovina s obsahem nanočástic stříbra vyráběná na Slovensku ve firmě VIPO a.s., Partizánske. Jedná se o vodný roztok síranu stříbrného s koncentrací stříbra (Ag^+) $2\,000\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato surovina je rozpustná ve vodě a je schopná tvořit vodný roztok. Je použitelná jako tekutý dezinfekční prostředek, který je zároveň vhodný také na konzervaci kosmetických surovin a kosmetických přípravků. Síran stříbrný obsažený ve Viposilveru je registrován pod číslem CAS 10294-26-5 [65].

Od výrobce je deklarován bakteriocidní, fungicidní a sporocidní účinek, přičemž minimální koncentrace při aplikaci činí $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ stříbra [65].

Viposilver by měl být skladován ve skleněných nebo plastových lahvích v suchu při teplotách v rozmezí 5 °C až maximálně 40 °C. Stabilita této suroviny je minimálně 6 měsíců při uzavřeném originálním balení [65].

U této suroviny byly provedeny zkoušky na baktericidní, fungicidní a sporocidní účinky. Tyto zkoušky byly provedeny Slovenskou zdravotnickou univerzitou v Bratislavě. Testy proběhly při 20 °C v nečistých podmínkách tvořených hovězím albuminem. Byl pozorován bakteriocidní účinek při 80% koncentraci této suroviny u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Fungicidní účinek byl pozorován u vegetativních buněk kvasinky *Candida albicans* a u plísně *Aspergillus niger*. Nakonec byl proveden test sporocidní aktivity u bakterie *Bacillus subtilis* [66].

Viposilver je surovina obsahující stříbro, kterou můžeme nalézt např. v krému na ruce od výrobce Tília [67].

3.3.2 PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm

Tento přípravek s obsahem stříbra je vyráběn společností Pharma Activ Czech s.r.o. a je volně dostupný ke koupení v lékárně. Podle informací zprostředkovaných na webových stránkách www.lekarna.cz, na které je možno tento produkt koupit je přípravek určený pro mastnou a problematiku pleť. Od výrobce je deklarován čistící, vyhlazující a regenerační účinek. Přípravek by měl být určený k ošetření tváře, dekoltu a je vhodný pro všechny typy pleti, a to bez ohledu na věk. Při používání je doporučeno přípravek nastříkat přímo na pleť nebo do ústní dutiny, avšak nemá být produkt polykán [68, 69].

Mezi pozitivní účinky, která má tento přípravek mít, patří [68, 69]:

- vhodný pro mastnou pleť a pleť trpící na akné,
- působí příznivě na rozšířené póry,
- snižuje vylučování mazu,
- má zklidňující účinky na podrážděnou pokožku a zčervenání,
- má regenerační a vyhlazující účinky,
- má dezinfekční účinky,
- má podíl na hojení drobnějších poranění,
- hygiena ústní dutiny formou výplachu.

3.4 Použité mikroorganismy ke stanovení antimikrobiální aktivity

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity 4 grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a jedna gramnegativní bakterie *Serratia marcescens*. Z kvasinek byla použita *Candida vini*. O všech použitých mikroorganismech více v kapitole 2.9.

3.5 Příprava bujónu a kultivačního média

3.5.1 Kultivace bakterií

Bujón byl připraven navážením 2,5 g Nutrient Broth (M244) od výrobce HIMEDIA na 100 ml destilované vody. Připravený bujón byl následně po 5 ml rozpipetován do zkumavek a vysterilizován. Vysterilizovaný bujón byl použit k zaočkování mikroorganismů použitých při ověření antimikrobiální aktivity [71].

Na přípravu kultivačního média bylo použito 5 g Nutrient Broth (M244) a 4 g Agar powder (RM026) na 200 ml destilované vody [71, 72].

Tabulka 2.: Složení kultivačního média pro bakterie

Složka	Obsah (g·l ⁻¹)
Masový pepton	10,0
Hovězí extrakt	10,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	20,0

3.5.2 Kultivace kvasinek

Na přípravu bujónu bylo na 50 ml destilované vody použito 2 g glukózy, 0,25 g peptonu a 0,25 g kvasničného extraktu. Do zkumavky bylo odpipetováno 5 ml takto připraveného bujónu a ponecháno ke sterilizaci. Vysterilizovaný bujón byl použit k zaočkování kvasinek.

Na přípravu kultivačního média bylo použito 10 g Malt Extract Agar Base (M137) na 200 ml destilované vody [73].

Tabulka 3.: Složení kultivačního média pro kvasinky

Složka	Obsah (g·l ⁻¹)
Sladový extrakt	30,0
Mykologický pepton	5,0
Agar	15,0

3.6 Ověření antimikrobiální aktivity

K ověření antimikrobiální aktivity vybraných vzorků byla použita jamková difúzní metoda. Do 200 ml vysterilizovaného živného média byly přidány 2 ml bujónu obsahujícího 24 hodinovou kulturu bakterie nebo kvasinky. Následně bylo inokulum rozlito do sterilních Petriho misek do vhodné výšky. Takto nalitý agar byl ponechán k zatuhnutí. Po zatuhnutí byly do agaru udělány 4 jamky pomocí korkovrtu o průměru 1 cm. Do 3 jamek bylo napipetováno 100 µl vzorku a do poslední jamky byla napipetována destilovaná voda jako kontrolní ukazatel. Vzorky byly kultivovány při 25 °C po dobu 72 hodin. Po ukončení kultivace byly sledované inhibiční zóny v okolí jamek se vzorky [55].

Pro každý mikroorganismus bylo vždy připraveno 9 misek na 3 vzorky s obsahem stříbra, přičemž každý vzorek stříbra byl napipetován do 3 misek.

Vyhodnocení antimikrobiální metody bylo provedeno měřením průměru inhibiční zóny s přesností na desetinu centimetru.

3.6.1 Statistické vyhodnocení antimikrobiální aktivity

Vyhodnocení bylo provedeno průměrováním naměřených dat. Pro jeden vzorek a jeden mikroorganismus byly připraveny 3 misky, kde každá miska obsahovala 3 nanesené vzorky s obsahem stříbra. Celkem bylo tedy zprůměrováno 9 hodnot průměrů velikosti inhibičních zón

na jedno stanovení. Kromě zprůměrování hodnot (1) byla vypočtena také směrodatná odchylka (2). Obě operace byly provedeny přes PC program MS-Excel.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2 n_i}{\sum n_i}} \quad (2)$$

3.7 Charakterizace částic

3.7.1 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla změřena u Viposilveru i přípravku od výrobce PHARMA AKTIV. Do kyvety bylo napipetováno 1 ml roztoku vzorku, následně byla kyveta vložena do DLS přístroje Malvern Zetasizer ZS a byla zjištěna distribuce a průměrná velikost částic [57].

Vyhodnocení bylo provedeno zprůměrováním přístrojem naměřených hodnot v PC programu MS-Excel.

3.7.2 Stanovení zeta potenciálu

Do kyvety byl opět odměřen 1 ml vzorku a zároveň byl do kyvety přidán elektrodový nástavec. Kyveta i s nástavcem byla vložena do DLS přístroje a byl změřen zeta potenciál. Částice obsažené ve vzorku jsou pokládány za stabilní, pokud se hodnota zeta potenciálu pohybuje mimo interval -30 až 30 mV [57].

Vyhodnocení bylo provedeno zprůměrováním přístrojem naměřených hodnot v PC programu MS-Excel.

3.7.3 Absorpční spektrum nanočástic

Do kyvety byl odměřen 1 ml vzorku nanostříbra. Pomocí UV-VIS nanofotometru byla změřena absorbance v rozmezí 300 až 800 nm. Vyhodnocení bylo provedeno vytvořením grafu absorpčního spektra z naměřených dat převedených do PC programu MS-Excel [36].

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

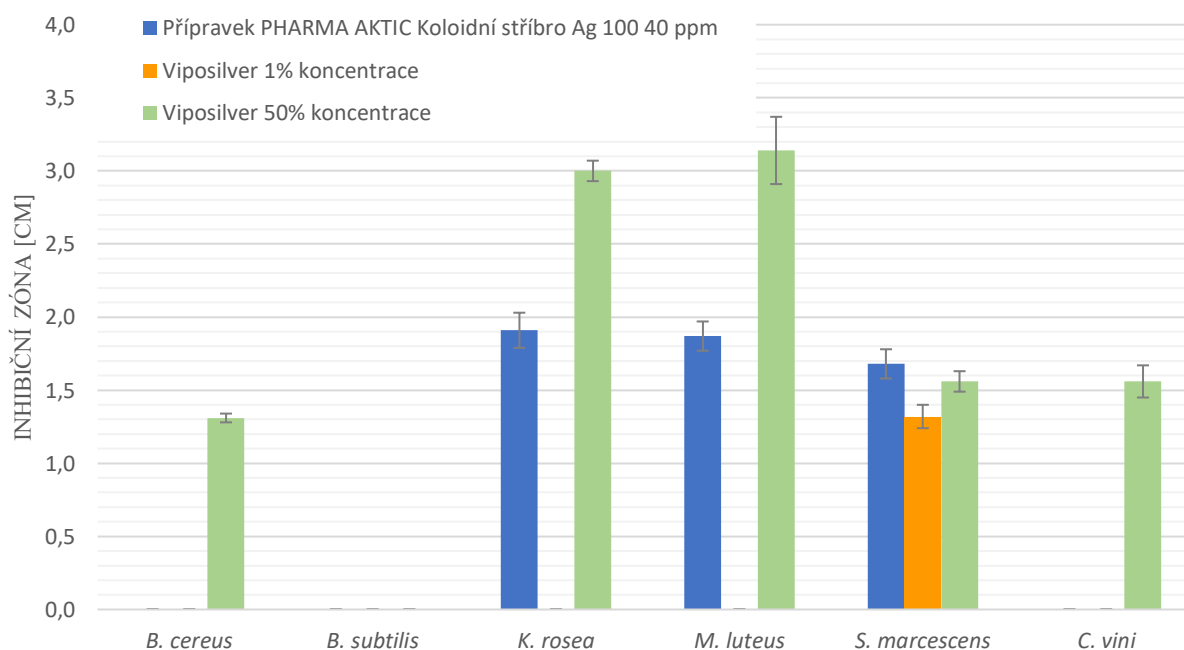
4.1 Ověření antimikrobiální aktivity

Ověření antimikrobiální aktivity bylo provedeno difúzní jamkovou metodou. Testy byly provedeny na jedné gramnegativní bakterii *Serratia marcescens* a 4 grampozitivních bakteriích *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rosea* a *Micrococcus luteus*. Dále byla metoda provedena u kvasinky *Candida vini*. Všechny mikroorganismy byly kultivované na univerzálním agaru a následně přeočkovány do bujónu na 24 hodin při 27 °C. Vyhodnocení bylo provedeno měřením průměru inhibiční zóny s přesností na desetinu centimetru.

V tabulce 4. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity na sledované mikroorganismy. Nejlepší antimikrobiální aktivitu vykazoval 50% roztok suroviny Viposilver. Naopak nejhorší se ukázal být 1% roztok této suroviny. U zakoupeného přípravku byla pozorována slabá antimikrobiální aktivita. Pouze u jednoho mikroorganismu bylo možné pozorovat antimikrobiální aktivitu všech použitých vzorků, a to u bakterie *S. marcescens*. Naopak u bakterie *B. subtilis* nebyla antimikrobiální aktivita vůbec pozorována.

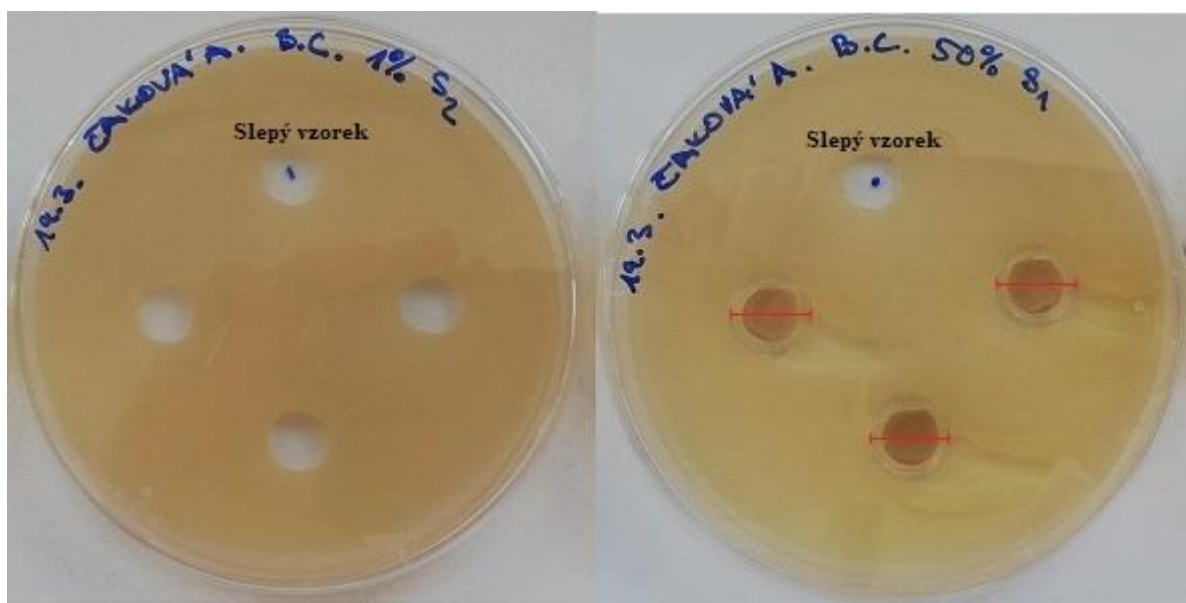
Tabulka 4.: Souhrnné výsledky antimikrobiální aktivity na sledované MO při použití přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro (P) a suroviny Viposilver (VS)

MO		P	1% VS	50% VS
<i>B. cereus</i>	ø (cm)	x	x	1,30±0,03
<i>B. subtilis</i>		x	x	x
<i>K. rosea</i>		1,9±0,1	x	3,0±0,1
<i>M. luteus</i>		1,9±0,1	x	3,1±0,2
<i>S. marcescens</i>		1,7±0,1	1,3±0,1	1,6±0,1
<i>C. vini</i>		x	x	1,6±0,1



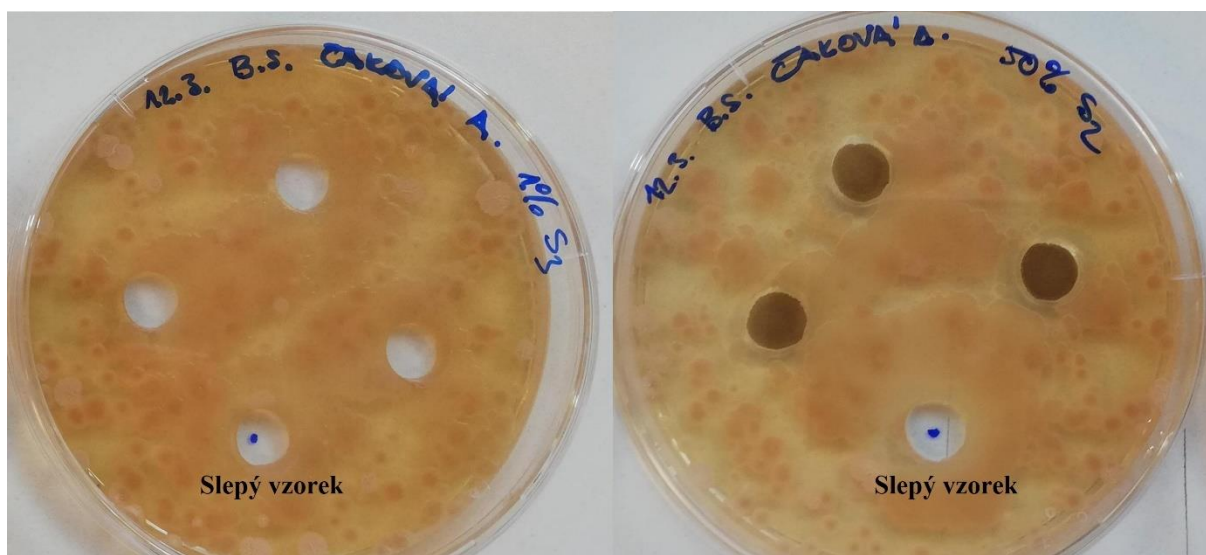
Obrázek 5.: Srovnání antimikrobiální aktivity na jednotlivé mikroorganismy

Na obrázku 5. je možné vidět graf srovnání antimikrobiální účinnosti dle použitého vzorku na jednotlivé mikroorganismy. Z grafu je možné vyčíst, že nejlepší antimikrobiální účinek vykazoval 50% Viposilver na použité bakterie *Micrococcus luteus* a *Kocuria rosea*. 1% Viposilver naopak nevykazoval téměř žádnou antimikrobiální aktivitu na vybrané mikroorganismy. U zakoupeného přípravku bylo možné pozorovat slabý antimikrobiální účinek pouze u stanovovaných bakterií *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* a *Serratia marcescens*.



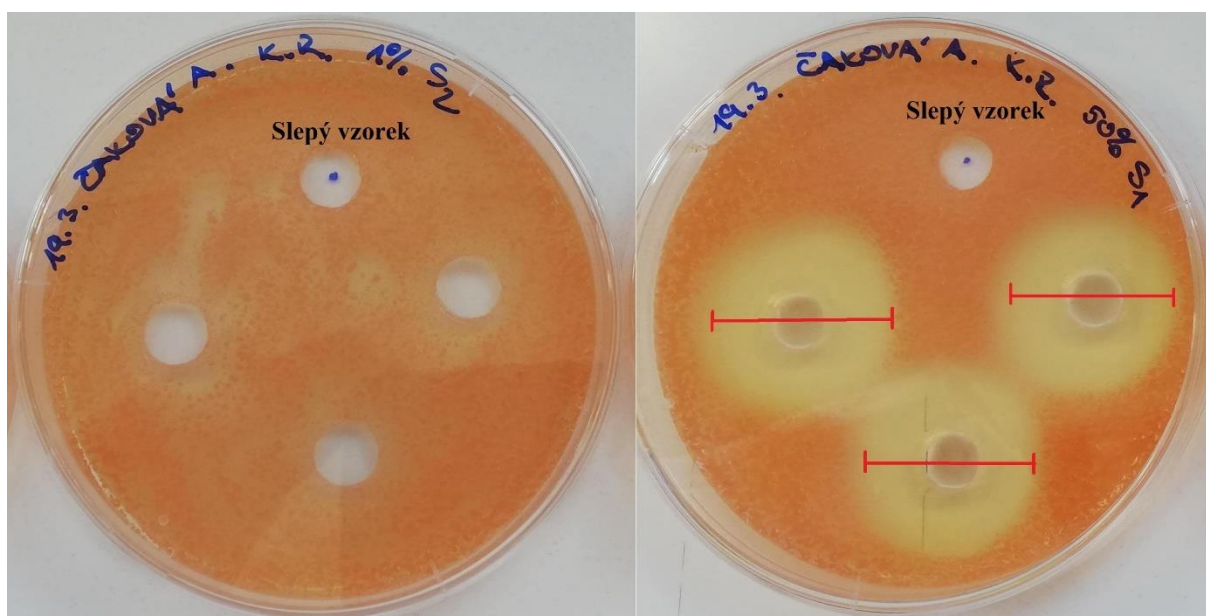
Obrázek 6.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Bacillus cereus*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 6. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na *Bacillus cereus* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 50% koncentrace Viposilveru byla pozorována inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální účinek. U 1% koncentrace této suroviny nebyla inhibice pozorována.



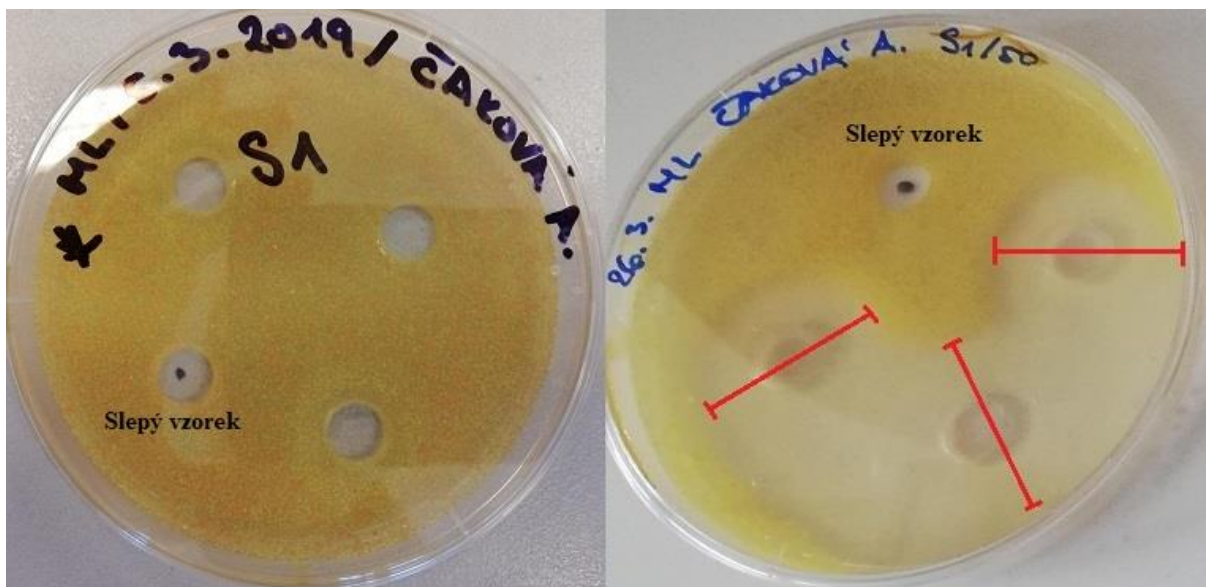
Obrázek 7.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Bacillus subtilis*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 7. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na *Bacillus subtilis* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 1% ani 50% koncentrace Viposilveru nebyla pozorována žádná inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální účinek.



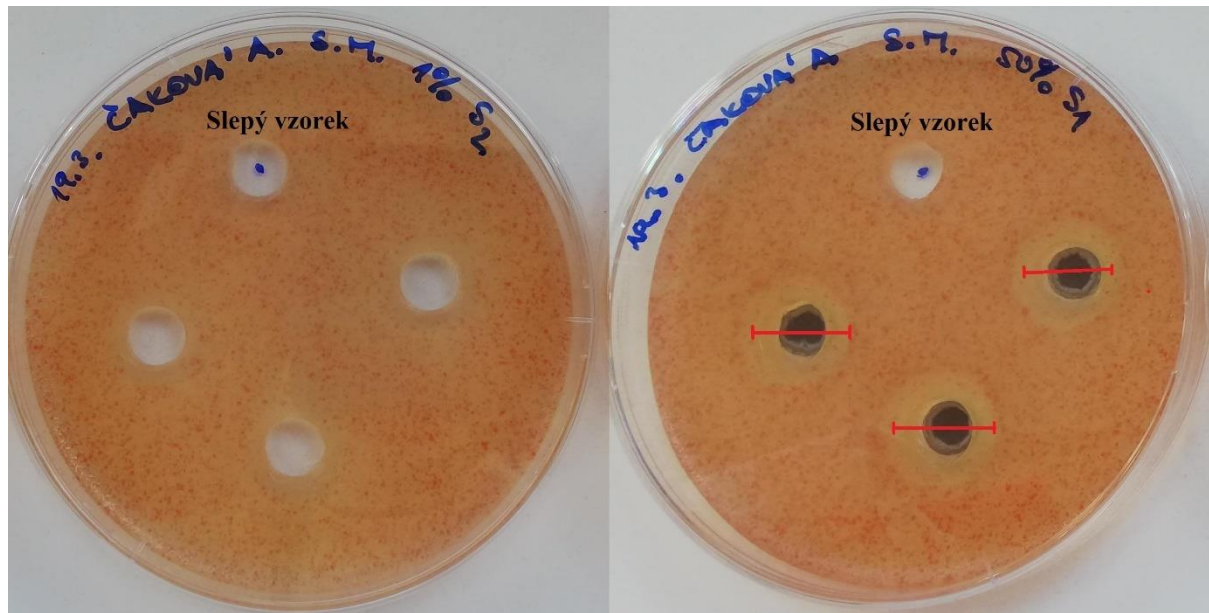
Obrázek 8.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Kocuria rosea*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 8. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na bakterii *Kocuria rosea* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 50% koncentrace Viposilveru byla pozorována inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální účinek. U 1% koncentrace Viposilver nebyla antimikrobiální aktivita pozorována.



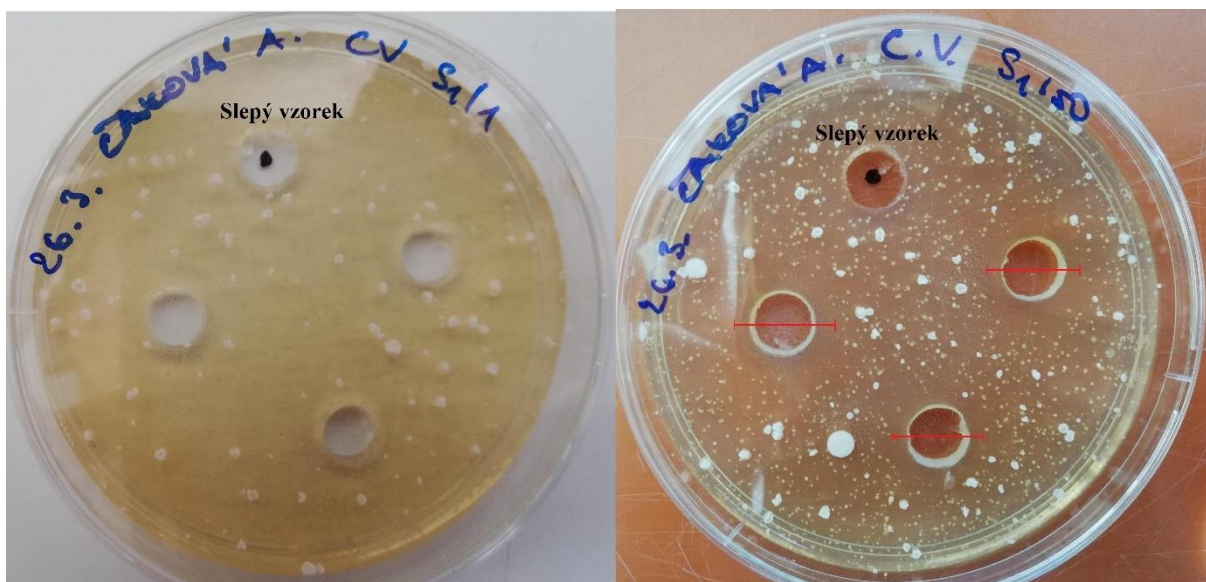
Obrázek 9.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Micrococcus luteus*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 9. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na *Micrococcus luteus* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 50% koncentrace Viposilveru byla pozorována inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální účinek. U 1% nebyla inhibice pozorována.



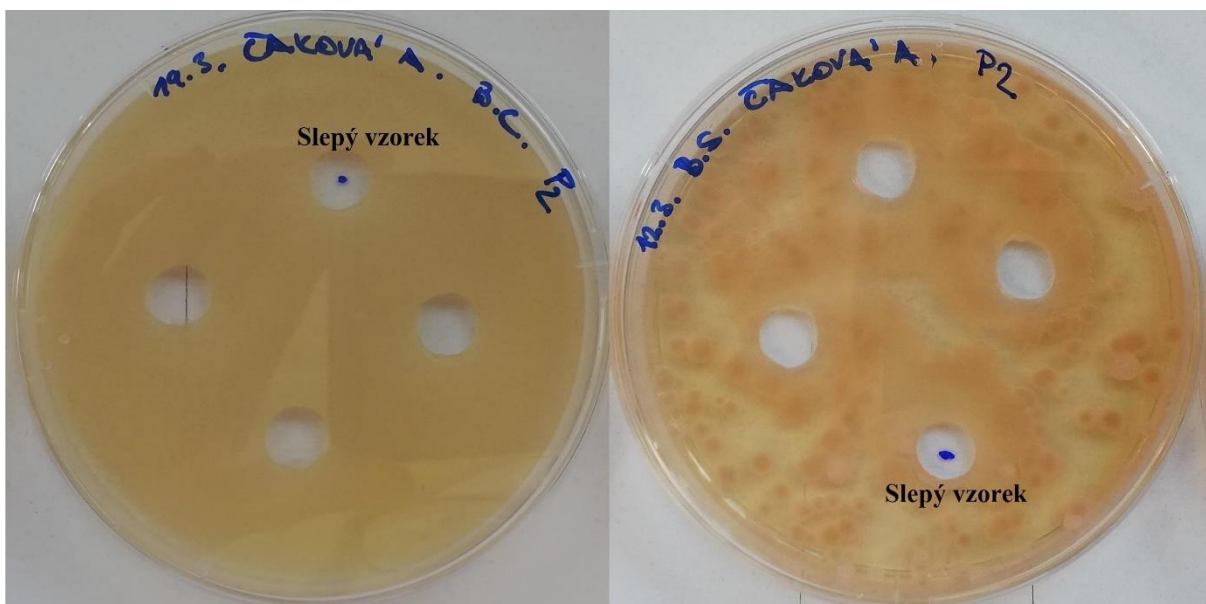
Obrázek 10.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Serratia marcescens*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 10. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na bakterii *Serratia marcescens* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 50% koncentrace Viposilveru byla pozorována inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální aktivitu, při použití 1% koncentrace suroviny, byla pozorována slabá antimikrobiální aktivita.



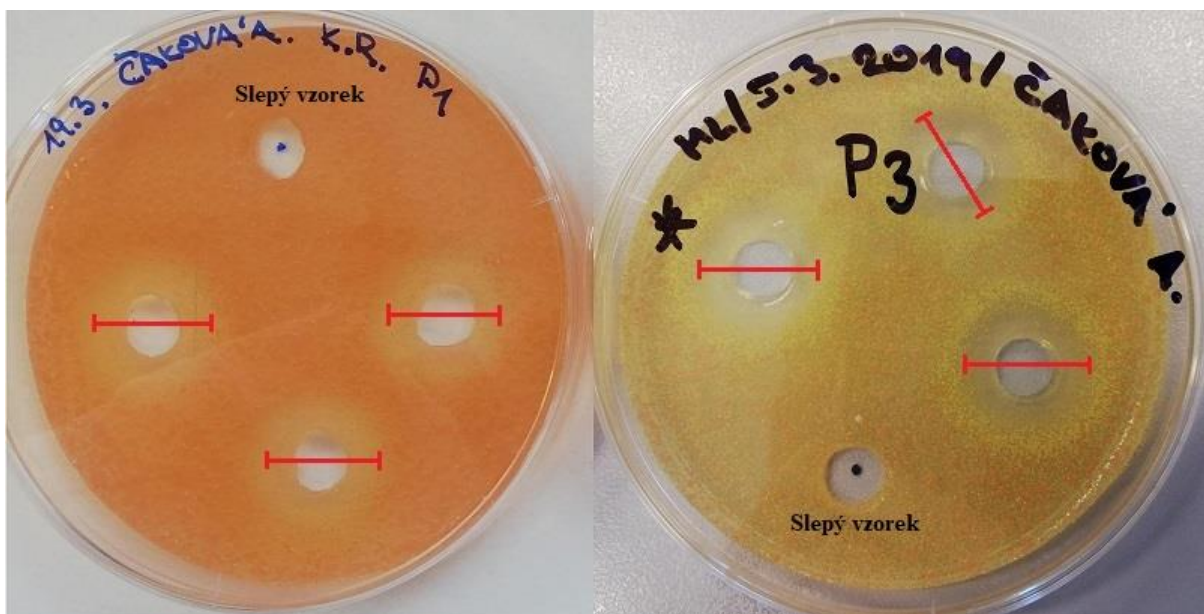
Obrázek 11.: Inhibiční zóny suroviny Viposilver na MO *Candida vini*, při 1% (vlevo) a 50% (vpravo) koncentraci

Na obrázku 11. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity suroviny Viposilver na kvasinku *Candida vini* při použití 1% a 50% koncentrace této suroviny. Při použití 50% koncentrace Viposilveru byla pozorována inhibiční zóna, která signalizovala antimikrobiální aktivitu. U 1% koncentrace suroviny nebyla pozorována inhibice růstu kvasinky.



Obrázek 12.: Inhibiční zóny přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro na MO *Bacillus cereus* (vlevo) a *Bacillus subtilis* (vpravo)

Na obrázku 12. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity přípravku Koloidní stříbro od výrobce PHARMA AKTIV na bakterie *B. cereus* a *B. subtilis* při použití 100% koncentrace. U obou mikroorganismů nebyla při použití tohoto přípravku pozorována antimikrobiální aktivita.



Obrázek 13.: Inhibiční zóny přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro na MO *Kocuria rosea* (vlevo) a *Micrococcus luteus* (vpravo)

Na obrázku 13. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity přípravku Koloidní stříbro od výrobce PHARMA AKTIV na bakterie *K. rosea* a *M. luteus* při použití 100% koncentrace. U obou mikroorganismů byla při použití tohoto přípravku pozorována inhibice růstu bakterií.



Obrázek 14.: Inhibiční zóny přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro na MO *Serratia marcescens* (vlevo) a *Candida vini* (vpravo)

Na obrázku 14. je možné vidět výsledky antimikrobiální aktivity přípravku Koloidní stříbro od výrobce PHARMA AKTIV na bakterii *S. marcescens* a kvasinku *C. vini* při použití 100% koncentrace. U bakterie byla pozorována inhibice růstu, u kvasinky nebyla antimikrobiální aktivita pozorována.

4.2 Stanovení velikosti částic

Velikost částic a polydisperzní index byly změřeny metodou DLS (viz. kapitola 2.8.1) za pomoci přístroje Malvern Zetasizer ZS. Velikost částic i polydisperzní index byly změřeny u vzorku suroviny Viposilver a přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro.

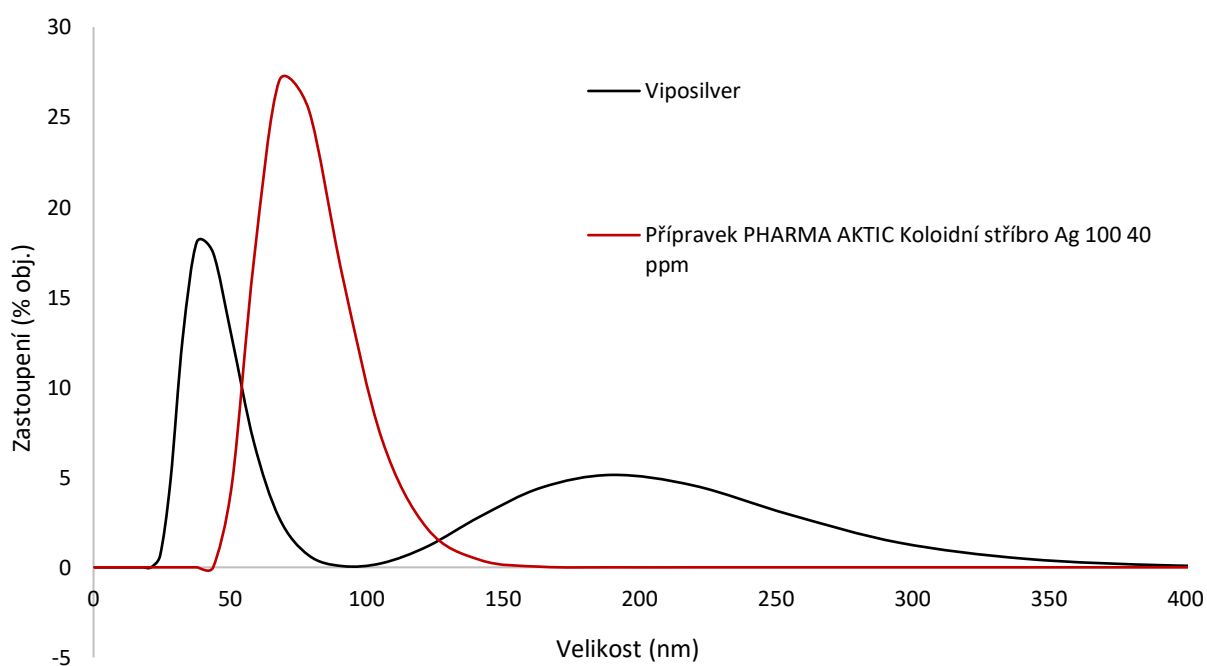
Tabulka 5.: Velikost částic a polydisperzní index

	Velikost (nm)	Polydisperzní index
Viposilver	355,3±124,1	0,524±0,078
PHARMA AKTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm	215,7±34,6	0,272±0,041

Průměrná velikost částic Viposilver byla 355,3±124,1 nm. U přípravku byla velikost menší, a to 215,7±34,6 nm. Obě hodnoty jsou však na nanočástice poměrně velké, důvodem může být např. agregace částic. Agregace částic se u nanomateriálů vyskytuje často, díky jejich velkému povrchu a interakcí částic mezi sebou [2]. Polydisperzní index byl u přípravku naměřen nižší (0,272±0,041), vzorek tedy odpovídá mírně polydisperznímu systému. U Viposilveru byl polydisperzní index vyšší než 0,4 (0,524±0,078), a odpovídá tak vysoce disperznímu systému.

Z obrázku 15. můžeme vyčíst, že největší zastoupení v surovině Viposilver měly částice okolo velikosti 30–40 nm. U přípravku jsou nejvíce zastoupené částice velikosti 55–75 nm.

Surovina Viposilver by dle výrobce neměla obsahovat nanočástice, ale pouze koloidní stříbro. Z výsledků však vyplývá, že jsou nanočástice v surovině přítomné. V přípravku byly taktéž naměřené nanočástice, výrobce ale na obale uvádí složení s obsahem koloidního stříbra (nano) [69].



Obrázek 15.: Procentuální zastoupení částic dle velikosti

4.3 Stanovení zeta potenciálu

Vedle velikosti částic byla změřena i stabilita nanočástic pomocí zeta potenciálu. Jako stabilní se považují částice s zeta potenciálem mimo interval -30 až 30 mV. Zeta potenciál byl opět změřen přístrojem Malvern Zetasizer ZS.

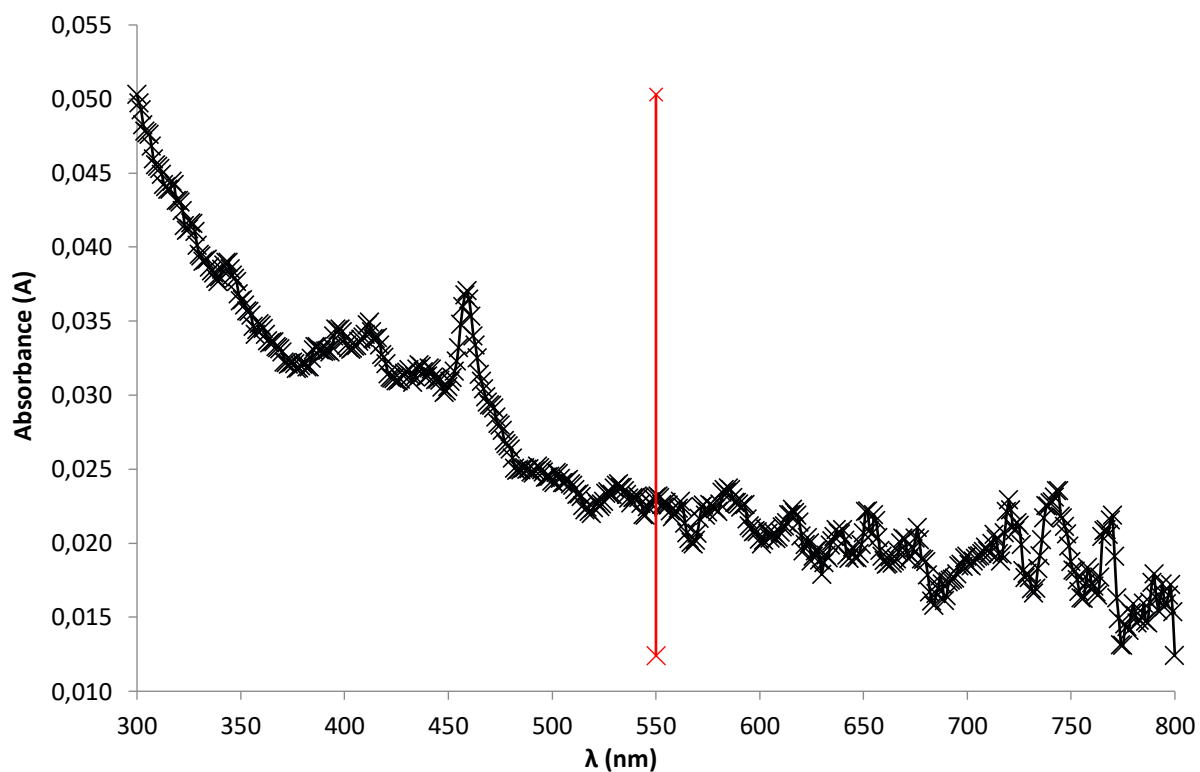
Tabulka 6.: Stabilita nanočástic stříbra – Zeta potenciál

	Zeta potenciál (mV)
Viposilver	-19,5±3,4
PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm	-53,4±0,5

U suroviny Viposilver byla hodnota zeta potenciálu pouze -19,5±3,4 mV, zatímco u přípravku byla hodnota vyšší, a to -53,4±0,5 mV. Z výsledků je tedy patrné, že částice přípravku je možné považovat za vysoce stabilní, zatímco u Viposilveru byly částice méně stabilní.

4.4 Absorpční spektrum nanočástic

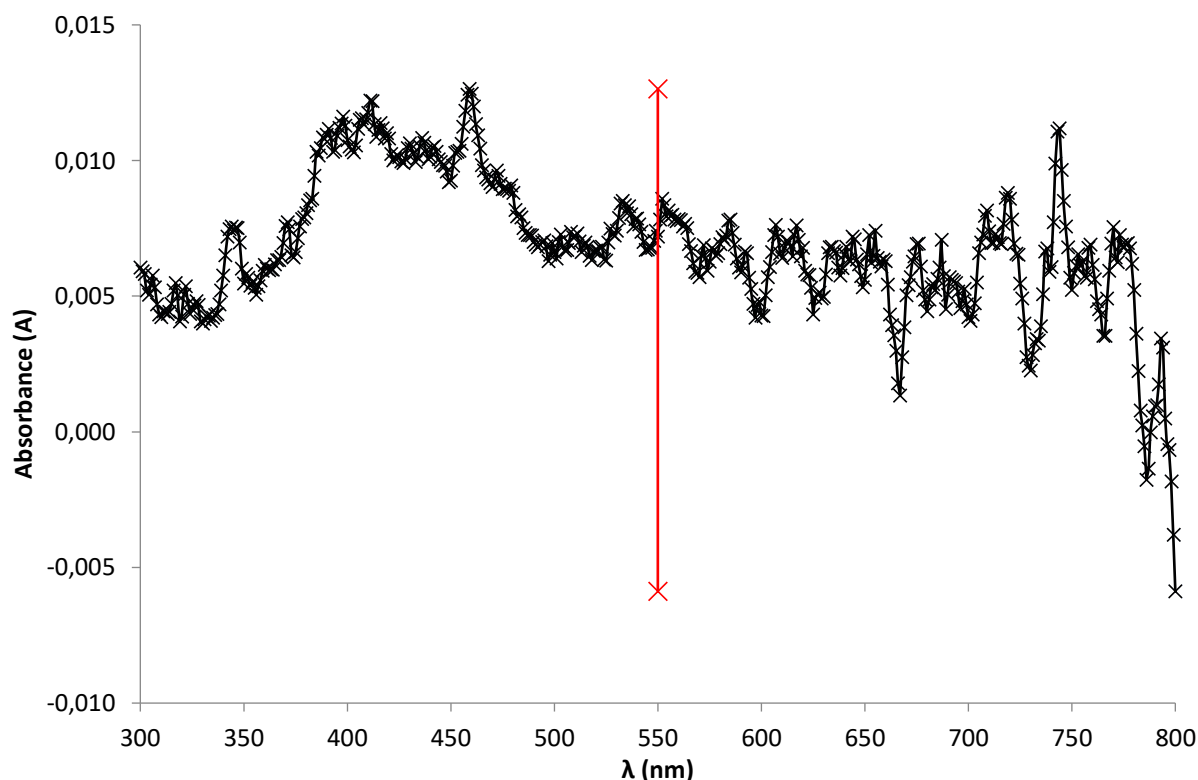
Absorpční spektrum nanočástic bylo změřeno pomocí Nanofotometru. Měření bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 300-800 nm pro Viposilver i pro přípravek PHARMA AKTIV Koloidní stříbro.



Obrázek 16.: Absorpční spektrum nanočástic suroviny Viposilver

Na obrázku 16. je možné vidět absorpční spektrum suroviny Viposilver. Nejvyšší absorbance nanočástic byla zaznamenána při vlnové délce 459 nm, tato vlnová délka by měla odpovídat

absorbanci nejvíce se vyskytujících částic, které v případě suroviny Viposilver byly v rozmezí velikosti 30-40 nm.



Obrázek 17.: Absorbance nanočástic stříbra přípravku PHARMA AKTIC Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm

Na obrázku 17. je možné vidět absorpční spektrum nanočástic přípravku PHARMA AKTIV Koloidní stříbro. Nevyšší absorbance byla zaznamenána stejně jako u suroviny Viposilver při vlnové délce 459 nm. Velikost částic přípravku, které se při této vlnové délce nejvíce absorbují, se pohybuje v rozmezí 55-75 nm.

Z výsledků je patrné, v obou vzorcích byly detekovány nanočástice stříbra. U obou vzorků byla pozorována antimikrobiální aktivita na vybrané druhy mikroorganismů, přičemž surovina Viposilver vykazovala lepší účinky nežli zakoupený přípravek.

Surovina Viposilver byla ke stanovení ředěna na 1% a 50% koncentraci, přičemž 1% koncentrace nebyla antimikrobiálně účinná téměř na žádný sledovaný mikroorganismus. Naopak 50% koncentrace již vykazovala značný antimikrobiální účinek. V přípravcích se ale v praxi využívají mnohem nižší koncentrace nanostříbra. Nejčastěji se setkáváme s koncentracemi pod jedno procento, a to i v desetinách, setinách až tisícinách procenta. Zakoupený přípravek obsahující nanočástice stříbra nebyl pro stanovení nijak ředěn. Jeho antimikrobiální aktivita byla pozorována u stanovovaných mikroorganismů *K. rosea*, *S. marcescens* a *M. luteus*. Na bakterii *B. subtilis* nebyl u všech vzorků po použití pozorován antimikrobiální účinek, což dokazuje také velkou odolnost této bakterie vůči antimikrobiálním látkám.

Průměrná velikost částic obou vzorků byla na nanočástice, které by se měly pohybovat v rozmezí 1-100 nm, poměrně velká. Nejvyšší zastoupení ve vzorcích měly částice, které již

lze považovat za nanočástice. Vyšší průměrná velikost částic byla pravděpodobně způsobena také agregací částic a polydisperzitou celého systému. Polydisperznost a agregace se potvrdila také změřením absorpčního spektra, které obsahovalo mnoho malých píků. Nejmenší naměřená absorbance u Viposilveru činila 0,0123 a nejvyšší pak 0,0503. U přípravku od firmy PHARMA AKTIV byla nejvyšší absorbance rovna 0,0126, zatímco nejnižší hodnota byla záporná, což je možné považovat za chybu při měření.

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem předložené bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřující se na stříbrné suroviny v kosmetice. Zabývá se jejich zamýšlenou funkcí, fyzikálně-chemickými charakteristikami, toxikologií spolu s otázkou jejich bezpečnosti. Dále bylo cílem stanovit antimikrobiální aktivitu u dvou surovin s obsahem nanočástic stříbra na vybrané mikroorganismy.

Ze zpracované teoretické části vyplývá, že stříbro má antimikrobiální účinky, přičemž tyto účinky byly známy již v minulosti. Kosmetických surovin s obsahem stříbra a stříbrných iontů je využíváno v kosmetice velké množství, některé z nich podléhají přísným regulacím a omezením, které mají zabránit jejich nevhodnému použití. Nanočástice stříbra, stejně jako všechny nanomateriály, jsou v kosmetice využívány čím dál více. Jejich využívání však nelze považovat za naprosto bezpečné. Syntéza i charakterizace nanočástic stříbra je popsána v mnoha literárních zdrojích, přičemž, co se syntézy týče, v poslední době se stále více přiklání k biologické výrobě nanostříbra. V dnešní době je známo již mnoho mikroorganismů, které jsou vůči antimikrobiálním účinkům nanostříbra citlivé. Patří sem nejrozmanitější rody, včetně několika, které mohou způsobovat vážné onemocnění, jako např. *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphilis typhus*, *Staphylococcus aureus* a nejrozmanitější druhy rodu *Candida*.

V praktické části je popsán postup, kterým byly provedeny jednotlivé testy a stanovení. Ke stanovení byly využity dva vzorky obsahující nanostříbro. Jedním vzorkem byla surovina s názvem Viposilver, kterou lze najít např. v krému na ruce od výrobce Tilia. Dalším vzorkem byl v lékárně zakoupený přípravek od výrobce PHARMA AKTIV s názvem Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm. Tento přípravek je určený pro mastnou a problematickou pleť, má být účinný proti akné, dále je deklarovaný dezinfekční a regenerační účinek, zároveň má být vhodný k ústní hygieně.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno měřením průměru vzniklých inhibičních zón, přičemž výsledné hodnoty byly statisticky vyhodnoceny pomocí PC programu MS-Excel. Nejlepší antimikrobiální aktivitu vykazoval Viposilver při použití 50% koncentrace, naopak při jeho 1% koncentraci nebyla antimikrobiální aktivita téměř vůbec sledována. Jako rezistentní se projevil vůči všem použitým vzorkům bakterie *B. subtilis* a proti přípravku a 1% koncentraci Viposilveru pak i *B. cereus* a *C. vini*. Jako citlivé se projevíly *K. rosea* a *M. luteus*, avšak pouze vůči 50% koncentraci Viposilveru. 50% koncentrace Viposilveru byla použita spíše pro zajímavost, jelikož takovou koncentraci stříbrné suroviny nelze v kosmetických přípravcích použít a ani se s ní nesetkáme. Reálnému použití se blíží spíše 1% koncentrace Viposilveru, i když i tato hodnota je celkem vysoká, běžně se v kosmetických přípravcích setkáváme pouze s koncentrací v desetinách až tisícinách procent nanostříbra.

Velikost částic byla změřena metodou DLS, kdy průměrné hodnoty byly za hranicemi velikosti nanomateriálu, což je ale možné vysvětlit hlavně agregací, ke které často u nanočástic dochází. Zeta potenciál, určující stabilitu, byl u přípravku větší nežli u suroviny Viposilver.

U absorpčního spektra jsme mohli pozorovat spektrum obsahující velké množství píků, které potvrdilo naměřenou polydisperzitu, která byla u obou vzorků poměrně vysoká. Oba vzorky měly absorpční maximum ve vlnové délce 459 nm, kde by měly absorbovat nejvíce zastoupené částice.

Z celkových výsledků tedy lze odvodit, že vzorky obsahovaly podíl (nano)částic stříbra, které u některých ze stanovovaných mikroorganismů vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Použité koncentrace suroviny Viposilver byly však několikanásobně vyšší než koncentrace surovin na bázi stříbra, které jsou v kosmetice používány, přičemž již při 1% koncentraci nebyla pozorována dostačující antimikrobiální aktivita.

Na tuto práci je možné navázat dalšími stanoveními a experimenty. Je možné pro stanovení použít např. více surovin či přípravků obsahujících nanostříbro. Dále je možné sledovat antimikrobiální aktivitu u širšího spektra mikroorganismů, provést stanovení např. u více druhů jednoho rodu a zjistit, zda jsou i druhové rozdíly co se citlivosti na nanostříbro týče. U již použité suroviny a přípravku by bylo možné provést stanovení i v dalších nepoužitých koncentracích, které se co nejvíce blíží koncentracím používaných v kosmetických přípravcích.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FERŤTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a praxi*. Praha: Maxdorf, 1994, 269 s. ISBN 80-85800-20-9.
- [2] COSTA, Raquel a SANTOS, Lúcia. *Delivery systems for cosmetics-From manufacturing to the skin of natural antioxidants*. Powder Technology. 2017, vol. 322, s. 402-416. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.07.086. ISSN 00325910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591017306320>
- [3] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Úřední věstník Evropské unie L 342, 22. 12. 2009, 209 s. Dostupný z <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- [4] KUNICKA-STYCZYŃSKA, A., SIKORA, M. a KALEMBA, D. *Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems*. Journal of Applied Microbiology. 2009, vol. 107, issue 6, s. 1903-1911. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x>
- [5] VOON, Han Ching, BHAT, Rajeev a RUSUL, Gulam. *Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2012, col. 11, issue 1, s. 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. ISSN 15414337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x>
- [6] KOKURA, Satoshi, HANDA, Osamu, TAKAGI, Tomohisa, ISHIKAWA, Takeshi, NAITO, Yuji a YOSHIKAWA, Toshikazu. *Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010, vol. 6, issue 4, s. 570-574. DOI: 10.1016/j.nano.2009.12.002. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154996341000002X>
- [7] DVOŘÁČKOVÁ, Svatava. *Rychlokurz chemie: od základní školy k přijímacím zkouškám na vysokou školu*. Vyd. 1. Olomouc: Rubico, 2003, 238 s. ISBN 80-85839-42-3.
- [8] VACÍK, Jiří. *Přehled středoškolské chemie v SPN*. Vyd. 2. Praha: SPN – pedagogické nakladatelství, 1999, 368 s. ISBN 80-723-5108-7.
- [9] HONZA, Jaroslav a MAREČEK, Aleš. *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. Vyd. 3. přepracované. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2002, 227 s. ISBN 80-718-2141-1.
- [10] GREENWOOD, N. N. a EARNSHAW, Alan. *Chemie prvků*. Praha: Informatorium, 1993. ISBN 80-85427-38-9.
- [11] Keilová V., Bencko V. Stříbro není jen krásný kov, z něhož se vyrábí šperky, ale také je o něm známo, že ničí nebezpečné choroboplodné zárodky, Moje zdraví, 6, 31-33 str. 2010.
- [12] LARA, Humberto H, GARZA-TREVIÑO, Elsa N, IXTEPAN-TURRENT, Liliana a SINGH, Dinesh K. *Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds*. Journal of Nanobiotechnology. 2011, vol. 9, issue 1. DOI: 10.1186/1477-3155-9-30. ISSN 1477-3155. Dostupné také z: <http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-9-30>
- [13] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén, 2005, 248 s. ISBN 80-246-1085-X.
- [14] PRABHU, Sukumaran a K POULOSE, Eldho. *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International

- Nano Letters. 2012, vol. 2, issue 1, s. 1-10. DOI: 10.1186/2228-5326-2-32. ISSN 2008-9295. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1186/2228-5326-2-32>
- [15] PANYALA, Nagender Reddy, PEÑA-MÉNDEZ, Eladia a HAVEL, María Josef. *Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?* Journal of Applied Biomedicine. 2008, vol. 6, issue 3, s. 117-129. DOI: 10.32725/jab.2008.015. ISSN 1214021X. Dostupné také z: <http://jab.zsf.jcu.cz/doi/10.32725/jab.2008.015.html>
- [16] VEČEŘOVÁ, Renata. *Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita*. Klinická farmakologie a farmacie [online]. Ústav mikrobiologie LF UP Olomouc, 2016, 30(3), 18-20 [cit. 11. 11. 2018]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2016/03/04.pdf>
- [17] LINTNER, Karl. *Cosmetic Ingredients: Definitions, Legal Requirements, and an Attempt to Harmonize (Global?) Characterization*. Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry. Elsevier, 2009, s. 31-53. DOI: 10.1016/B978-0-8155-1569-2.50009-9. ISBN 9780815515692. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815515692500099>
- [18] *COSMETICS EUROPE: GUIDELINES ON COSMETIC PRODUCT LABELLING*. Belgie, 2011. Dostupné také z: https://www.cosmeticseurope.eu/files/8814/6407/5369/Guidelines_on_Cosmetic_Product_Labelling_-_2011.pdf
- [19] *COSMETICS EUROPE: COMPLIANCE WITH REGULATION 1223/2009 ON COSMETIC PRODUCTS _ ROLES AND RESPONSIBILITIES ALONG THE SUPPLY CHAIN*. Belgie, 2016. Dostupné také z: https://www.cosmeticseurope.eu/files/9314/7306/9079/Compliance_with_regulation_1223-2009_new.pdf
- [20] SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Guidance on safety assessment of nanomaterials in cosmetics, SCCS/1484/12. Dostupné také z: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf
- [21] NAFISI, S. a MAIBACH, H.I. *Nanotechnology in Cosmetics*. Cosmetic Science and Technology. Elsevier, 2017, s. 337-369. DOI: 10.1016/B978-0-12-802005-0.00022-7. ISBN 9780128020050. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128020050000227>
- [22] CHIARI-ANDRÉO, Bruna Galdorfini, Maria Gabriela José de ALMEIDA-CINCOTTO, João Augusto OSHIRO, Cibele Yumi Yamada TANIGUCHI, Leila Aparecida CHIAVACCI a Vera Lucia Borges ISAAC, 2019. Nanoparticles for cosmetic use and its application. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. Elsevier, 2019, 113-146. DOI: 10.1016/B978-0-12-816504-1.00013-2. ISBN 9780128165041. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128165041000132>
- [23] GAJBHIYE, Swati, SAKHARWADE, Satish, PRUCEK, Robert, et al. *Silver Nanoparticles in Cosmetics: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity*. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications. 2016, vol. 6, issue 1, s. 48-53. DOI: 10.4236/jcdsa.2016.61007. ISSN 2161-4105. Dostupné také z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jcdsa.2016.61007>

- [24] BANACH, Marcin a Jolanta PULIT-PROCIAK, 2016. Synthesis, characteristics, and biocidal activity of silver nanoparticles. *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials*. Elsevier, 2016, 367-399. DOI: 10.1016/B978-0-323-41533-0.00012-X. ISBN 9780323415330. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032341533000012X>
- [25] MICHNA, Aneta, MORGA, Maria, ADAMCZYK, Zbigniew a KUBIAK, Katarzyna. *Monolayers of silver nanoparticles obtained by green synthesis on macrocation modified substrates*. Materials Chemistry and Physics. 2019, vol. 227, s. 224-235. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.01.072. ISSN 02540584. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058419300859>
- [26] ARYA, Anju, MISHRA, Vaibhav a CHUNDAWAT, Tejpal Singh. *Green synthesis of silver nanoparticles from green algae (Botryococcus braunii) and its catalytic behavior for the synthesis of benzimidazoles*. Chemical Data Collections. 2019, vol. 20. DOI: 10.1016/j.cdc.2019.100190. ISSN 24058300. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405830019300333>
- [27] BASNIWAL, Rupesh Kumar a JAIN, Vinod Kumar. *Biogenic Silver Nanoparticles Synthesis Route Based on Microalgae. Recent Trends in Materials and Devices*. Cham: Springer International Publishing, Springer Proceedings in Physics. 2017, s. 191-198. DOI: 10.1007/978-3-319-29096-6_25. ISBN 978-3-319-29095-9. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-29096-6_25
- [28] ZHANG, Guangyu, LIU, Yan, GAO, Xiaoliang a CHEN, Yuyue. *Synthesis of silver nanoparticles and antibacterial property of silk fabrics treated by silver nanoparticles*. Nanoscale Research Letters. 2014, vol. 9, issue 1. DOI: 10.1186/1556-276X-9-216. ISSN 1556-276X. Dostupné také z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-9-216>
- [29] MANDAL, Saikat, ARUMUGAM, Sujatha K., PASRICHA, Renu a SASTRY, Murali. *Silver nanoparticles of variable morphology synthesized in aqueous foams as novel templates*. Bulletin of Materials Science. 2005, vol. 28, issue 5, s. 503-510. DOI: 10.1007/BF02711244. ISSN 0250-4707. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02711244>
- [30] ZHU, Junjie, LIAO, Xuehong a CHEN, Hong-Yuan. *Electrochemical preparation of silver dendrites in the presence of DNA*. Materials Research Bulletin. 2001, vol. 36, issue 9, s. 1687-1692. DOI: 10.1016/S0025-5408(01)00600-6. ISSN 00255408. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025540801006006>
- [31] Thirumalai Arasu, V & Duraipandian, Prabhu & M, Soniya. (2010). *Stable silver nanoparticle synthesizing methods and its applications J*. Journal of Bioscience Research. vol. 1., s. 259-270.
- [32] GUZMAN, Maribel, DILLE, Jean a GODET, Stéphane. *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2012, vol. 8, issue 1, s. 37-45. DOI: 10.1016/j.nano.2011.05.007. ISSN 15499634. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963411001791>

- [33] PANÁČEK, Aleš, KVÍTEK, Libor, PRUCEK, Robert, et al. *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity*. The Journal of Physical Chemistry B. 2006, vol. 110, issue 33, s. 16248-16253. DOI: 10.1021/jp063826h. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp063826h>
- [34] TURKEVICH, John a HILLIER, James. *Electron Microscopy of Colloidal Systems*. Analytical Chemistry. 1949, vol. 21, issue 4, s. 475-485. DOI: 10.1021/ac60028a009. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60028a009>
- [35] SCHÄFER, Bernd, TENTSCHERT, Jutta a LUCH, Andreas. 2011. *Nanosilver in Consumer Products and Human Health: More Information Required!* Environmental, Science and Technology. 2011, vol. 45, issue 17, s. 7589-7590. DOI: 10.1021/es200804u. ISSN 0013-936X. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es200804u>
- [36] JOSE CHIRAYIL, Cintil, ABRAHAM, Jiji, KUMAR MISHRA, Raghvendra, GEORGE, Soney C. a THOMAS, Sabu. *Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles*. Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization. Elsevier, 2017, s. 1-36. DOI: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00001-3. ISBN 9780323461399. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323461399000013>
- [37] KIM, Jun Sung, KUK, Eunye, YU, Kyeong Nam, et al. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2007, vol. 3, issue 1, s. 95-101. DOI: 10.1016/j.nano.2006.12.001. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963406003467>
- [38] LAVAKUMAR, Velayutham, MASILAMANI, K, RAVICHANDIRAN, Velayutham, VENKATESHAN, N, SAI GOPAL, D.V.R, ASHOK KUMAR, CK a SOWMYA, C. *Promising upshot of silver nanoparticles primed from Gracilaria crassa against bacterial pathogens*. Chemistry Central Journal. 2015, vol. 9, issue 1. DOI: 10.1186/s13065-015-0120-5. ISSN 1752-153X. Dostupné také z: <http://journal.chemistrycentral.com/content/9/1/42>
- [39] PIETRZAK, Katarzyna, PUCHALSKI, Michał, OTLEWSKA, Anna, WRZOSEK, Henryk, GUIAMET, Patricia, PIOTROWSKA, Małgorzata a GUTAROWSKA, Beata. *Microbial diversity of pre-Columbian archaeological textiles and the effect of silver nanoparticles misting disinfection*. Journal of Cultural Heritage. 2017, vol. 23, issue 1, s. 138-147. DOI: 10.1016/j.culher.2016.07.007. ISSN 12962074. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1296207416301352>
- [40] CHOONG, Vivian, ONG GAIK AI, Lisa a KIM SUAN, Tong. *Synthesis of silver nanoparticles mediated by endophytic fungi associated with orchids and its antibacterial activity*. Materials Today: Proceedings. 2018, vol. 5, issue 10, s. 22093-22100. DOI: 10.1016/j.matpr.2018.07.074. ISSN 22147853. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221478531831873X>
- [41] PAL, Sukdeb, TAK, Yu Kyung a SONG, Joon Myong. *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-*

- Negative Bacterium Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 2007, vol. 73, issue 6, s. 1712-1720. DOI: 10.1128/AEM.02218-06. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02218-06>
- [42] RAI, Mahendra, YADAV, Alka a GADE, Aniket. *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology Advances. 2009, vol. 27, issue 1, s. 76-83. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000918>
- [43] KIM, Jin Sik, SONG, Kyung Seuk, SUNG, Jae Hyuck, RYU, Hyun Ryol, CHOI, Byung Gil, CHO, Hyun Sun, LEE, Jin Kyu a YU, Il Je. *Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles*. Nanotoxicology. 2012, vol. 7, issue 5, s. 953-960. DOI: 10.3109/17435390.2012.676099. ISSN 1743-5390. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2012.676099>
- [44] BURCZYK, Frank a GIANNI, Aggy. *Lexikon kosmetiky od A do Z: jak se vyhnout alergiím, jak rozpoznat, co je škodlivé, jak rozumět deklaracím*. Praha: Pragma, 2003, 180 s. ISBN 80-7205-939-4.
- [45] Cosmetic ingredient database: CosIng, *Evropská komise* [online]. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>
- [46] Chlorid stříbrný. [Online], Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o.: Praha, ČR, 5. 11. 2010. [cit. 11. 11. 2018]. [Revize 5. 3. 2018]. Dostupné z https://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/ch/bezplist_504.pdf
- [47] Chlorid stříbrný, 21.25.90000.002.06 [Online], SAFINA a.s.: Brno, ČR, 30.11.2010. [cit. 11. 11. 2018]. [Revize 5. 8. 2011]. Dostupné z <http://fzp.ujep.cz/kpv/vav/pedolab/BL/BichloridStribny.pdf>
- [48] Chlorid stříbrný, 01-2119967399-16-xxxx [Online], Carl Roth GmbH + Co KG: Karlsruhe, Německo, 12. 8. 2016. [cit. 11. 11. 2018]. [Revize 26. 1. 2017]. Dostupné z https://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/6/SDB_6877_CZ_CS.pdf
- [49] YOO, Juyeon, SO, Hyeongsub, YANG, MinHo a LEE, Kun-Jae. *Effect of chloride ion on synthesis of silver nanoparticle using retrieved silver chloride as a precursor from the electronic scrap*. Applied Surface Science. 2019, vol. 475, s. 781-784. DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.01.032. ISSN 01694332. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433219300327>
- [50] DA SILVA FERREIRA, Veronica, CONZFERREIRA, Mateus Eugenio, T.R. LIMA, Luís Maurício, FRASÉS, Susana, DE SOUZA, Wanderley a SANT'ANNA, Celso. *Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria*. Enzyme and Microbial Technology. 2017, vol. 97, s. 114-121. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.018. ISSN 01410229. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102291630223X>
- [51] Síran stříbrný. [Online], Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o.: Praha, ČR, 2. 2. 2011. [cit. 24. 11. 2018]. [Revize 18. 8. 2017]. Dostupné z https://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/s/bezplist_394.pdf

- [52] Síran stříbrný. [Online], Lach-Ner, s.r.o.: Neratovice, ČR, 13. 6. 2016. [cit. 24. 11. 2018]. [Revize 13. 6. 2016]. Dostupné z <https://www.verkon.cz/laboratorni-chemikalie-lachner/siran-stribny/>
- [53] Síran stříbrný. [Online], Sigma-Aldrich spol. s.r.o.: Praha, ČR, 28. 9. 2017. [cit. 24.11.2018]. [Revize 13. 12. 2018]. Dostupné z https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=497266&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D10294-26-5%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dpartialmaxfocus%3Dproduct%26lang%3Den%26region%3DCZ%26focus%3Dproduct%26gclid%3DCj0KCQiA8_PfBRC3ARIsAOzJ2uq8H6nkmusx0BpkQXKpvXshCUsRBrAnAUp_2VpNSig3_d-tuktZoFMaAo3-EALw_wcB
- [54] BURSOVÁ, Šárka, DUŠKOVÁ, Marta, NECIDOVÁ, Lenka, KARPÍŠKOVÁ Renáta a MYŠKOVÁ, Petra. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [55] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. *Skripta ke cvičení: z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8787-3. Dostupné také z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/docs/Mikrobiologie.pdf
- [56] © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [57] BHATTACHARJEE, Sourav. *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*. Journal of Controlled Release. 2016, vol. 235, s. 337-351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. ISSN 01683659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>
- [58] LU, Guang Wei a GAO, Ping. *Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery*. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Elsevier, 2010, s. 59-94. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4. ISBN 9780815520252. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815520252100034>
- [59] GÖRNER, Fridrich a VALÍK, Ľubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [60] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [61] VOTAVA, Miroslav, a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [62] HARRIGAN, Wilkie F. *Laboratory methods in food microbiology*. 3. vyd. San Diego: Academic Press, 1998, 532 s. ISBN 01-232-6043-4.

- [63] P. Mousumi, G. Renu, K. Suman, T. Rajeev, *Kocuria rosea: an emerging pathogen in acute bacterial meningitis- case report*, *J. Microbiol. Antimicrob. Agents* 1 (1) (2015) 4–7.
- [64] MUÑOZ MONTTOYA, Juan Esteban, MALDONADO MORAN, Miguel Ángel, BARRAGAN ARDILA, Jorge Alberto, CAVANZO HENAO, Paula Giovanna, MUÑOZ RODRIGUEZ, Erik Edgardo a CENTANARO MEZA, Gabriel Alfonso. *Brain abscess by Kocuria rosea: Case report and literature review*. *Interdisciplinary Neurosurgery*. 2017, vol. 7, s. 59-61. DOI: 10.1016/j.inat.2016.11.007. ISSN 22147519. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214751916301220>
- [65] Viposilver. VIPO a.s.: Partizánske, SK, 3. 6. 2014. [cit. 15. 2. 2019].
- [66] PIECKOVÁ, Elena a GAJDOŠ, Martin. *Stanovenie účinnosti dezinfekčnej látky: VIPOSILVER*. [cit. 23.2.2019]. Bratislava: Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave NRC pre dezinfekciu a sterilizáciu, 2018.
- [67] TÍLIA krém na ruky Silver, 100 ml. Drogeria, gastro, čistiace a kancelárske potreby. Kamiko.sk [online]. [cit. 16. 2. 2019]. Dostupné z: <https://www.kamiko.sk/hygienicky-servis/mydl-abrazvne-pasty-krm-y-dezinfekcia/tlia-krm-na-ruky-silver--ml>
- [68] PHARMA ACTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm 50 ml. Lékárna.cz. Zdraví nás baví [online]. [cit. 16. 2. 2019]. Copyright © 2019 Pears Health Cyber, s.r.o. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/aurum-koloidni-strebro-ag-100-40-ppm-50ml/>
- [69] Koloidní stříbro Ag100 40ppm 50ml spray - Pharmaactiv.com. Doplnky stravy Pharma Activ - Pharmaactiv.com [online]. Copyright © Pharmaactiv.com, všechna práva vyhrazena [cit. 16. 2. 2019]. Dostupné z: <https://www.pharmaactiv.com/krasa-a-pece/koloidni-strebro-ag100-40ppm-50ml-spray/>
- [70] 2006/257/ES: Rozhodnutí komise ze dne 9. února 2006, kterým se mění rozhodnutí 96/335/ES, kterým se stanoví soupis a společná nomenklatura přísad používaných v kosmetických prostředcích. Úřední věstník Evropské unie L 97, 5. 4. 2006, 528 s. Dostupný z <https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2006/257/oj>
- [71] Nutrient Broth with 1% Peptone. [Online]. Himedia - Čaderský-Envitek, spol s.r.o.: ČR, 02/2015. [cit. 17. 05. 2019]. Dostupné z: <http://www.himedialabs.com/TD/M244.pdf>
- [72] Agar powder, Bacteriological. [Online]. Himedia - Čaderský-Envitek, spol s.r.o.: ČR. [cit. 17. 05. 2019]. Dostupné z: <http://www.himedialabs.com/TD/GRM026.pdf>
- [73] Malt Extract Agar Base, Mycological Peptone. [Online]. Himedia - Čaderský-Envitek, spol s.r.o.: ČR, 02/2018. [cit. 17. 05. 2019]. Dostupné z: <http://www.himedialabs.com/TD/M137.pdf>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BC – *Bacillus cereus*

BS – *Bacillus subtilis*

CV – *Candida vini*

DLS – Dynamický rozptyl světla (*Dynamic Light Scattering*)

EDX – Rentgenová spektrometrie (*Energy-dispersive X-ray Analysis*)

HEED – Difrakce vysoko energetických elektronů (*High-energy electron diffraction*)

I – středně rezistentní

KR – *Kocuria rosea*

MIC – Minimální inhibiční koncentrace (*Minimum inhibitory concentration*)

ML – *Micrococcus luteus*

MO – Mikroorganismus

P – Přípravek PHARMA AKTIV Koloidní stříbro Ag 100 40 ppm

PDI – Polydisperzní index

R – rezistentní

S – citlivý

SDS – Dodecyl sulfát sodný (*Sodium dodecyl sulfate*)

SM – *Serratia marcescens*

TEM – Transmisní elektronová mikroskopie (*Transmission Electron Microscopy*)

VS – Surovina Viposilver

8. PŘÍLOHY

Tabulka 7.: Naměřené inhibiční zóny pro MO *Bacillus cereus*

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		0	0	0	0	0	0	1,3	1,4	1,3
2		0	0	0	0	0	0	1,3	1,3	1,3
3		0	0	0	0	0	0	1,3	1,3	1,3
průměr		0			0			1,30±0,03		

Tabulka 8.: Naměřené inhibiční zóny pro MO *Bacillus subtilis*

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		0	0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0	0	0	0	0
3		0	0	0	0	0	0	0	0	0
průměr		0			0			0		

Tabulka 9.: Naměřené inhibiční zóny pro MO *Kocuria rosea*

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		2,0	1,8	1,8	0	0	0	3,0	2,9	3,0
2		2,1	2,0	2,0	0	0	0	3,0	3,0	3,1
3		1,9	1,8	1,8	0	0	0	2,9	3,1	3,0
průměr		1,9±0,1			0			3,0±0,1		

Tabulka 10.: Naměřené inhibiční zóny pro MO *Micrococcus luteus*

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		1,7	1,9	1,9	0	0	0	3,0	2,9	3,4
2		1,8	2,0	1,8	0	0	0	3,1	3,3	3,5
3		1,8	1,9	2,0	0	0	0	3,2	2,8	3,1
průměr		1,9±0,1			0			3,1±0,2		

Tabulka 11.: Naměřené inhibiční zóny pro MO *Serratia marcescens*

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		1,6	1,8	1,7	1,4	1,3	0	1,6	1,6	1,6
2		1,6	1,6	1,8	1,4	1,3	0	1,6	1,6	1,5
3		1,6	1,8	1,6	1,3	1,2	0	1,4	1,6	1,5
průměr		1,7±0,1			1,3±0,1			1,6±0,1		

Tabulka 12.: Tabulka 8.: Naměřené inhibiční zóny pro MO Candida vini

Vzorek	ø (cm)	P	P	P	1% VS	1% VS	1% VS	50% VS	50% VS	50% VS
Miska		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		0	0	0	0	0	0	1,6	1,5	1,5
2		0	0	0	0	0	0	1,4	1,6	1,6
3		0	0	0	0	0	0	1,7	1,7	1,4
průměr		0			0			1,7±0,1		